

제 3 차년도
최종보고서

BSPN 00317-952-4

해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구

A Study on the Development of Novel and Biomedically
Available Substances from Marine Organisms

1997. 1

연구 기관
한국해양연구소

과학기술처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구”의 보고서로 제출합니다.

1997년 1월

연구 기관 : 한국해양연구소

연구 책임자 : 신 종 현

연구 원 : 서영완, 조기웅, 노정래

정호성, 홍기훈, 김석현

정창수, 감동진, 박선규

최승민, 유신재, 최진우

권개경, 이상훈, 강영철

강성호, 모상준, 백은주

윤태미, 조연정, 최영희

이미경, 조세경, 이근영

오충훈

연구 조 원 : 유소영, 김보연

위탁연구기관 : 한국화학연구소

연구 원 : 이종교, 김지현, 김혜수

피미경

요 약 문

I. 제 목

해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양천연물 화학은 그 역사는 짧으나 급속히 성장하는 분야이다. 이미 7,000 이상의 신물질의 구조가 결정되었으며 의·약학, 화학, 생물학 등 여러 관련분야의 연구에 필수적인 정보와 연구수단을 제공하여 이들의 발전에 크게 기여하고 있다. 해양천연물의 학문적, 산업적 중요성을 인식한 선진국에서는 이 분야를 21세기 생명공학의 핵심분야의 하나로 간주하고 막대한 연구노력을 기울인 결과 무수한 생리활성 신물질을 발견하였으며 이미 60여 물질특허를 획득하였다. 유용효소와 고분자 물질을 포함하는 수종의 선도물질은 이미 상업화에 성공하였거나 가까운 시일내에 시판될 것으로 예측되고 있다. 그러나 국내에서는 생명공학적 관심이 육상의 식물과 미생물에만 국한되어 있으며 해양생물은 주목을 거의 받지 못하고 있다. 유용자원을 확보하기 위한 국가간의 경쟁이 급증하는 현실과 해양천연물의 막대한 중요성을 고려할 때 이 분야의 연구는 대단히 시급하다.

본 연구진에 의하여 기 수행된 해양천연물 탐색연구의 결과를 기초로 하여 수행되는 이 과제에 최종 연구목표는 해양생물로부터 생리활성 신물질과 유용 신효소 및 고분자물질의 개발에 있다. 또한 이 과정에서 천연물의 분리 및 구조결정, 생리활성 검색방법, 해양미생물의 분리, 배양 등 연구기술의 개발도 함께 추구될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 우리나라 연안의 다양한 지역과 남극연안에 서식하는 저서균체 동물을 채집하여 분류하였다. 문헌조사, 조추출물에 대한 생리활성도 검색과 화학적 분석의 결과를 종합하여 중점연구대상 시료를 선정하였다.

2. 다양한 크로마토그래피 기술을 이용하여 2차 대사물질을 분리하였으며 분광자료의 해석과 화학반응의 결과를 종합하여 구조를 결정하였다. 정제된 천연물에 대하여 광범위한 생리활성을 측정하였다.

3. 해양환경에 서식하는 미생물 균주를 분리하였다. 효소활성 효과가 우수한 균주를 선정, 대량 배양하여 효소를 분리 생화학적 특성을 분석하였다.

4. 다수의 생리활성 검색방법을 확립하였다. 또한 기존의 검색방법을 개선한 새로운 활성 측정방법을 개발하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 남해안과 남극연안의 여러지역에서 600 kg 이상의 저서동물 시료를 채집, 동정하였다. 이들은 강장동물 11종, 해면동물 43종, 원색동물 4종등 58종의 군체동물로 동정되었다. 남, 동해와 태평양 심해저, 남극연안등에서 채집한 퇴적물, 동·식물, 해수등 다양한 해양 환경으로부터 2,000여 방선균을 비롯한 7,000여 미생물 균주를 분리, 배양하였다.

2. 조추출물에 대한 생리활성 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 7종의 강장동물과 8종의 해면동물을 중점연구대상으로 선정하였으며 다양한 크로마토그래피 기술을 이용하여 32종의 신물질들을 포함한 50여종의 천연물을 분리하였다. 유기반응과 분광자료 해석에 의하여 이들 sesquiterpenoids, diterpenoids, carotenoids, secosteroids, polyhydroxysteroids, steroidal hemiacetals, cyclopropyl oxylipins, pyridinium carboxylates, polyacetylenes, cyclitol-containing glycolipids 등으로 구조가 결정되었으며 다수의 물질이 항박테리아, 세포독성, 효소저해등의 생리활성 효과를 갖고 있음을 확인하였다.

3. 기존의 생리활성 검색방법을 개선하기 위하여 해양 발광세균의 발광 현상을 이용한 고감도 항미생물과 phospholipase A₂ 활성 및 동 효소에 대한 저해제 탐색의 새로운 검색방법이 개발되었다. 또한 lipase, superoxide dismutase, haloperoxidase 등 유용효소에 대한 활성검색방법이 확립되었다. 이와 아울러 방사성동위원소를 사용하지 않는 reverse transcriptase의 저해 활성 검색법 및 항산화 활성과 RNA 분해 활성 검색법도 수립되었다.

4. 채집한 미생물에 대한 항균과 항진균 활성검색결과가 우수한 방선균과 세균 균주를 선정하였다. 또한 효소활성 검색에 의하여 lipase(24종), phospholipase A₁(12종), superoxide dismutase(5종), agarase(2종), 체외 다당류(1종)등을 생산하는 균주를 선정하였다. 이중 2 종류의 superoxide dismutase를 생산하는 균주들의 대량배양과 이 효소의 분리 정제를 완료하였으며 체외 phospholipase A₁의 분리 정제가 완료되었다. 분리된 효소의 다양한 생화학적 특성을 분석하였다.

요약하여 본 1단계에서는 해양생물로부터 신물질과 유용물질의 개발에 대한 장기적인 연구를 위한 기초를 확립하였으며 국내에서도 해양생물에 대한 화학적 연구와 개발의 성공 가능성이 높은 것을 입증하였다.

SUMMARY

I. Title

A Study on the Development of Novel and Biomedically Available Substances from Marine Organisms

II. Objectives and Significances

Marine natural products chemistry is one of the fastest developing fields of sciences. Despite its relatively short history, more than 7,000 novel compounds have been isolated from various marine organisms. Knowledge on secondary metabolites of marine organisms has greatly contributed to the progress of many related fields including medicinal sciences, chemistry, and biology by providing valuable informations and research means.

Acknowledging the great academic and industrial importance of marine natural products, leading countries have considered this field as an essential part of biotechnology of the 21st century, and invested tremendous efforts which have resulted in the isolation of numerous biologically active and structurally unique compounds culminating in more than 60 patents. Some lead compounds including enzymes and bioactive polymers have been either already commercially available or expected to appear in the market in near future. However, biotechnological concern in Korea has been focused mainly on the metabolites of plants and microorganisms of terrestrial origin, while marine organisms have attracted only very limited attention. Considering the increasing international competition for valuable substances from natural resources and the tremendous potential of marine organisms research in this field is a matter of urgency.

Based on the results of previous exploratory studies by this research group, the ultimate objective of this long-term project is the development of novel marine natural products possessing biomedical potentials. Developments of industrially available macromolecules including novel enzymes will be also pursued. In addition, new biological and chemical techniques including isolation and structure determination of complex molecules, bioactivity screening methods, as well as isolation and cultivation of marine microorganisms will be developed.

III. Contents and Scope

1. Benthic colonial animals have been collected from various sites of Korean and Antarctic waters and taxonomically classified. Target organisms have been selected by a combination of literature survey, bioactivity tests, and chemical analysis of organic crude

extracts.

2. Secondary metabolites have been isolated by utilizing various chromatographic techniques. Structures of novel compounds have been determined by combined chemical and spectral analysis. Purified compounds have been extensively tested for bioactivity.

3. Strains of microorganisms have been isolated from various marine environments. Based upon the results of bioactivity tests, strains possessing significant enzyme activity have been selected and cultivated in large-scale. Substances responsible for the bioactivity have been isolated and analyzed for biochemical characters.

4. Various bioactivity assay systems have been installed. In addition, new activity testing methods of improved efficiency and safety have been developed.

IV. Results and Suggestions

1. More than 600 kg of benthic colonial animals have been collected from the various sites of Korean and Antarctic waters. These specimens have been classified to total 58 species of coelenterates(11), sponges(43), and tunicates(4). In addition, more than 7,000 microbial strains including 2,000 actinomycetes have been isolated from diverse marine environments such as algae, animals, sea water, and especially sediments of the South and East Sea, mid-Pacific, and the Antarctic.

2. Based upon the results of bioactivity tests and chemical analyses, 7 species of coelenterates and 8 species of sponges have been selected for chemical investigation. More than 50 metabolites including 32 novel compounds have been isolated by utilizing various chromatographic techniques. By combined chemical and spectral methods, the structures of these compounds have been determined as sesqui- and di-terpenoids, carotenoids, secosteroids, polyhydroxysteroids, steroidal hemiacetals, cyclopropyl oxylipins, pyridinium carboxylates, polyacetylenes, and cyclitol-containing glycolipids. Several compounds have exhibited significant antimicrobial, cytotoxic, and/or enzyme inhibiting activities.

3. As a part of efforts to improve current screening system, a new method of antimicrobial activity and a phospholipase A₂ inhibition activity tests have been developed using marine luminescent bacteria. Assay systems for enzymes including lipase, superoxide dismutase, and haloperoxidase have been also installed. Nonisotopic assay method of viral reverse transcriptase and methods of antioxidant and RNA-cleavage assay have been also installed.

4. Based upon the results of antibacterial and antifungal activity tests, several strains of bacteria and actinomycetes have been selected for chemical investigation. In addition, strains producing lipase(24), phospholipase A(12), superoxide dismutase (5), agarase (2), and extracellular polysaccharides (1) have been selected from the corresponding assays. Large-scale cultivation and purification of 2 kinds of superoxide dismutase and extracellular phospholipase A₁ were completed. Biochemical characters of purified enzymes have been investigated.

In summary, this study has established foundations for a long-term research on the developments of novel and biomedically available substances from marine organisms. The results of the first phase's research have clearly demonstrated the possibility of successful chemical investigation and utilization of marine organisms in Korea.

1. $\int_0^1 x^2 dx = \frac{1}{3} x^3 \Big|_0^1 = \frac{1}{3} (1^3 - 0^3) = \frac{1}{3}$
 2. $\int_0^1 x^3 dx = \frac{1}{4} x^4 \Big|_0^1 = \frac{1}{4} (1^4 - 0^4) = \frac{1}{4}$
 3. $\int_0^1 x^4 dx = \frac{1}{5} x^5 \Big|_0^1 = \frac{1}{5} (1^5 - 0^5) = \frac{1}{5}$
 4. $\int_0^1 x^5 dx = \frac{1}{6} x^6 \Big|_0^1 = \frac{1}{6} (1^6 - 0^6) = \frac{1}{6}$
 5. $\int_0^1 x^6 dx = \frac{1}{7} x^7 \Big|_0^1 = \frac{1}{7} (1^7 - 0^7) = \frac{1}{7}$
 6. $\int_0^1 x^7 dx = \frac{1}{8} x^8 \Big|_0^1 = \frac{1}{8} (1^8 - 0^8) = \frac{1}{8}$
 7. $\int_0^1 x^8 dx = \frac{1}{9} x^9 \Big|_0^1 = \frac{1}{9} (1^9 - 0^9) = \frac{1}{9}$
 8. $\int_0^1 x^9 dx = \frac{1}{10} x^{10} \Big|_0^1 = \frac{1}{10} (1^{10} - 0^{10}) = \frac{1}{10}$
 9. $\int_0^1 x^{10} dx = \frac{1}{11} x^{11} \Big|_0^1 = \frac{1}{11} (1^{11} - 0^{11}) = \frac{1}{11}$
 10. $\int_0^1 x^{11} dx = \frac{1}{12} x^{12} \Big|_0^1 = \frac{1}{12} (1^{12} - 0^{12}) = \frac{1}{12}$

11. $\int_0^1 x^{12} dx = \frac{1}{13} x^{13} \Big|_0^1 = \frac{1}{13} (1^{13} - 0^{13}) = \frac{1}{13}$
 12. $\int_0^1 x^{13} dx = \frac{1}{14} x^{14} \Big|_0^1 = \frac{1}{14} (1^{14} - 0^{14}) = \frac{1}{14}$
 13. $\int_0^1 x^{14} dx = \frac{1}{15} x^{15} \Big|_0^1 = \frac{1}{15} (1^{15} - 0^{15}) = \frac{1}{15}$
 14. $\int_0^1 x^{15} dx = \frac{1}{16} x^{16} \Big|_0^1 = \frac{1}{16} (1^{16} - 0^{16}) = \frac{1}{16}$
 15. $\int_0^1 x^{16} dx = \frac{1}{17} x^{17} \Big|_0^1 = \frac{1}{17} (1^{17} - 0^{17}) = \frac{1}{17}$
 16. $\int_0^1 x^{17} dx = \frac{1}{18} x^{18} \Big|_0^1 = \frac{1}{18} (1^{18} - 0^{18}) = \frac{1}{18}$
 17. $\int_0^1 x^{18} dx = \frac{1}{19} x^{19} \Big|_0^1 = \frac{1}{19} (1^{19} - 0^{19}) = \frac{1}{19}$
 18. $\int_0^1 x^{19} dx = \frac{1}{20} x^{20} \Big|_0^1 = \frac{1}{20} (1^{20} - 0^{20}) = \frac{1}{20}$
 19. $\int_0^1 x^{20} dx = \frac{1}{21} x^{21} \Big|_0^1 = \frac{1}{21} (1^{21} - 0^{21}) = \frac{1}{21}$
 20. $\int_0^1 x^{21} dx = \frac{1}{22} x^{22} \Big|_0^1 = \frac{1}{22} (1^{22} - 0^{22}) = \frac{1}{22}$

목 차

요약문	(3)
그림목차	(13)
표목차	(19)
제 1 장. 서론	1
제 2 장. Gorgonians의 대사물질	5
2. 1. 서론	5
2. 2. <i>Muricella</i> sp.의 대사물질	6
2. 3. <i>Euplexaura anastomosans</i> 의 대사물질	27
2. 4. 실험방법	37
제 3 장. Hydroids의 대사물질	97
3. 1. 서론	97
3. 2. <i>Solanderia secunda</i> 의 대사물질	100
3. 3. 실험방법	111
제 4 장. 해면동물의 대사물질	190
4. 1. 서론	190
4. 2. <i>Petrosia corticata</i> 의 대사물질	194
4. 3. <i>Caminatus awashimensis</i> 의 대사물질	214
4. 4. 실험방법	218
제 5 장. 해양미생물로부터 유용효소 분리정제	242
5. 1. 서론	242
5. 2. 해양미생물 균주 분리 및 보존	242
5. 3. 유용효소 검색 및 분리정제	243
5. 4. 실험방법	253
제 6 장. 생리활성도 측정체계 구축	273
6. 1. 서론	273
6. 2. 생리활성도 측정체계 구축	273
6. 3. 해양발광세균의 이용방법 개발	279

제 7 장. 결론	283
참고문헌	285
위탁연구	293

Contents

Summary	(3)
List of Figures	(13)
List of Tables	(19)
Chapter 1. Introduction	1
제 2 장. Metabolites of gorgonians	5
2. 1. Introduction	5
2. 2. Metabolites of <i>Muricella</i> sp.	6
2. 3. Metabolites of <i>Euplexaura anastomosans</i>	27
2. 4. Experimental	37
제 3 장. Metabolites of hydroids	97
3. 1. Introduction	100
3. 2. Metabolites of <i>Solanderia secunda</i>	111
3. 3. Experimental	190
제 4 장. Metabolites of sponges	190
4. 1. Introduction	190
4. 2. Metabolites of <i>Petrosia corticata</i>	194
4. 3. Metabolites of <i>Caminatus awashimensis</i>	214
4. 4. Experimental	218
Chapter 5. Isolation of novel enzymes from marine microorganisms	242
5. 1. Introduction	242
5. 2. Isolation of marine microbial strains	242
5. 3. Screening and purification of novel enzymes	243
5. 4. Experimental	253
Chapter 6. Biological activity analysis	273
6. 1. Introduction	273
6. 2. Biological activity analysis methods	273
6. 3. Development of new assay methods using microbial bioluminiscence	279

Chapter 7. Conclusion	283
References	285
Assigned Study	293

List of Figures

Fig. 2-1. Structures of pseudopterosins and lophotoxin.	7
Fig. 2-2. Cladiellin derivatives isolated from gorgonians of the genus <i>Muricella</i>	9
Fig. 2-3. Structures of muricellaxanthin and amarouciaxanthin A.	12
Fig. 2-4. Partial structures and key HMBC correlations of muricellaxanthin.	14
Fig. 2-5. Carotenoids isolated from marine algae.	16
Fig. 2-6. 9,10-Secosteroids isolated from a gorgonian of the genus <i>Muricella</i>	18
Fig. 2-7. Secosteroids isolated from marine organisms.	22
Fig. 2-8. Structures of anastomosacetals A-D.	29
Fig. 2-9. Proton NMR spectrum of cladiellin.	48
Fig. 2-10. Carbon NMR spectrum of cladiellin.	49
Fig. 2-11. Proton NMR spectrum of muricellaxanthin.	50
Fig. 2-12. Carbon NMR spectrum of muricellaxanthin.	51
Fig. 2-13. Proton COSY spectrum of muricellaxanthin.	52
Fig. 2-14. HMQC spectrum of muricellaxanthin.	53
Fig. 2-15. HMBC spectrum of muricellaxanthin(upfield).	54
Fig. 2-16. HMBC spectrum of muricellaxanthin(downfield).	55
Fig. 2-17. Proton NMR spectrum of 95J-18-A.	56
Fig. 2-18. Carbon NMR spectrum of 95J-18-A.	57
Fig. 2-19. Proton NMR spectrum of 95J-18-B.	58
Fig. 2-20. Carbon NMR spectrum of 95J-18-B.	59
Fig. 2-21. Proton NMR spectrum of 95J-18-C.	60
Fig. 2-22. Carbon NMR spectrum of 95J-18-C.	61
Fig. 2-23. Proton COSY spectrum of 95J-18-C.	62
Fig. 2-24. HMQC spectrum of 95J-18-C.	63
Fig. 2-25. Proton NMR spectrum of 95J-18-D.	64
Fig. 2-26. Carbon NMR spectrum of 95J-18-D.	65
Fig. 2-27. Proton COSY spectrum of 95J-18-D.	66
Fig. 2-28. HMQC spectrum of 95J-18-D.	67
Fig. 2-29. Proton NMR spectrum of 95J-18-E.	68
Fig. 2-30. Carbon NMR spectrum of 95J-18-E.	69
Fig. 2-31. Proton COSY spectrum of 95J-18-E.	70
Fig. 2-32. HMQC spectrum of 95J-18-E.	71

Fig. 2-33. Proton NMR spectrum of 95J-18-F .	72
Fig. 2-34. Carbon NMR spectrum of 95J-18-F .	73
Fig. 2-35. Proton COSY spectrum of 95J-18-F .	74
Fig. 2-36. HMQC spectrum of 95J-18-F .	75
Fig. 2-37. Proton NMR spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	76
Fig. 2-38. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	77
Fig. 2-39. DEPT spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	78
Fig. 2-40. Proton COSY spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	79
Fig. 2-41. HMQC spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	80
Fig. 2-42. HMBC spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	81
Fig. 2-43. NOESY spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).	82
Fig. 2-44. Proton NMR spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).	83
Fig. 2-45. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).	84
Fig. 2-46. DEPT spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).	85
Fig. 2-47. Proton COSY spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).	86
Fig. 2-48. HMQC spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).	87
Fig. 2-49. Proton NMR spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).	88
Fig. 2-50. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).	89
Fig. 2-51. DEPT spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).	90
Fig. 2-52. Proton COSY spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).	91
Fig. 2-53. Proton NMR spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).	92
Fig. 2-54. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).	93
Fig. 2-55. DEPT spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).	94
Fig. 2-56. Proton COSY spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).	95
Fig. 2-57. HMQC spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).	96
Fig. 3-1. Metabolites of hydroids.	98
Fig. 3-2. Structures of solandelactones A-I and semi-synthetic derivatives.	101
Fig. 3-3. Selected nOe correlations based on NOESY experiments of 91-10-L and -M .	104
Fig. 3-4. Structures of the known oxylipins constanolactones and halicholactone.	105
Fig. 3-5. Newman projection of conformation of 91-10-S based on NOESY experiments and CD analysis.	107
Fig. 3-6. 2 <i>S</i> -(-)-Dimethyl-menthoxy carbonyl(MC) chloride.	108
Fig. 3-7. Proposed biosynthetic pathway of solandelactones.	110
Fig. 3-8. Proton NMR spectrum of solandelactone A(91-10-A).	126

Fig. 3-9. Carbon NMR spectrum of solandelactone A(91-10-A):	127
Fig. 3-10. Proton COSY spectrum of solandelactone A(91-10-A):	128
Fig. 3-11. TOCSY spectrum of solandelactone A(91-10-A):	129
Fig. 3-12. HMQC spectrum of solandelactone A(91-10-A):	130
Fig. 3-13. HMBC spectrum of solandelactone A(91-10-A):	131
Fig. 3-14. Proton NMR spectrum of solandelactone B(91-10-B):	132
Fig. 3-15. Carbon NMR spectrum of solandelactone B(91-10-B):	133
Fig. 3-16. Proton COSY spectrum of solandelactone B(91-10-B):	134
Fig. 3-17. TOCSY spectrum of solandelactone B(91-10-B):	135
Fig. 3-18. HMQC spectrum of solandelactone B(91-10-B):	136
Fig. 3-19. HMBC spectrum of solandelactone B(91-10-B):	137
Fig. 3-20. Proton NMR spectrum of solandelactone C(91-10-C):	138
Fig. 3-21. Carbon NMR spectrum of solandelactone C(91-10-C):	139
Fig. 3-22. Proton COSY spectrum of solandelactone C(91-10-C):	140
Fig. 3-23. Proton NMR spectrum of solandelactone D(91-10-D):	141
Fig. 3-24. Carbon NMR spectrum of solandelactone D(91-10-D):	142
Fig. 3-25. Proton COSY spectrum of solandelactone D(91-10-D):	143
Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of solandelactone E(91-10-E):	144
Fig. 3-27. Carbon NMR spectrum of solandelactone E(91-10-E):	145
Fig. 3-28. Proton COSY spectrum of solandelactone E(91-10-E):	146
Fig. 3-30. HMQC spectrum of solandelactone E(91-10-E):	147
Fig. 3-31. Proton NMR spectrum of solandelactone F(91-10-F):	148
Fig. 3-32. Carbon NMR spectrum of solandelactone F(91-10-F):	149
Fig. 3-33. Proton COSY spectrum of solandelactone F(91-10-F):	150
Fig. 3-34. HMQC spectrum of solandelactone F(91-10-F):	151
Fig. 3-35. Proton NMR spectrum of solandelactone G(91-10-G):	152
Fig. 3-36. Carbon NMR spectrum of solandelactone G(91-10-G):	153
Fig. 3-37. Proton COSY spectrum of solandelactone G(91-10-G):	154
Fig. 3-38. HMQC spectrum of solandelactone G(91-10-G):	155
Fig. 3-39. Proton NMR spectrum of solandelactone H(91-10-H):	156
Fig. 3-40. Carbon NMR spectrum of solandelactone H(91-10-H):	157
Fig. 3-41. Proton COSY spectrum of solandelactone H(91-10-H):	158
Fig. 3-42. Proton NMR spectrum of solandelactone I(91-10-I):	159
Fig. 3-43. Carbon NMR spectrum of solandelactone I(91-10-I):	160
Fig. 3-44. Proton COSY spectrum of solandelactone I(91-10-I):	161

Fig. 3-45. HMQC spectrum of solandelactone I(91-10-I).	162
Fig. 3-46. Proton NMR spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).	163
Fig. 3-47. Carbon NMR spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).	164
Fig. 3-48. Proton COSY spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).	165
Fig. 3-49. Proton NMR spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).	166
Fig. 3-50. Carbon NMR spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).	167
Fig. 3-51. Proton COSY spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).	168
Fig. 3-52. HMQC spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).	169
Fig. 3-53. Proton NMR spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).	170
Fig. 3-54. Carbon NMR spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).	171
Fig. 3-55. Proton COSY spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).	172
Fig. 3-56. HMQC spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).	173
Fig. 3-57. NOESY spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).	174
Fig. 3-58. Proton NMR spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).	175
Fig. 3-59. Carbon NMR spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).	176
Fig. 3-60. Proton COSY spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).	177
Fig. 3-61. HMQC spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).	178
Fig. 3-62. NOESY spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).	179
Fig. 3-63. Proton NMR spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone E.	180
Fig. 3-64. Proton COSY spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone E.	181
Fig. 3-65. NOESY spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone E.	182
Fig. 3-66. Proton NMR spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone F.	183
Fig. 3-67. Proton COSY spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone F.	184
Fig. 3-68. NOESY spectrum of bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)solandelctone F.	185
Fig. 3-69. Proton NMR spectrum of bis(menthoxycarbonyl)solandelctone F.	186
Fig. 3-70. Proton COSY spectrum of bis(menthoxycarbonyl)solandelctone F.	187
Fig. 3-71. Proton NMR spectrum of (2 <i>S</i>)-dimethyl menthoxycarbonylmalate.	188
Fig. 3-72. Proton NMR spectrum of (2 <i>R</i>)-dimethyl menthoxycarbonylmalate.	189
Fig. 4-1. Potential drugs isolated from sponges.	192
Fig. 4-2. Partial structures of compound 917-1-I.	212
Fig. 4-3. Structures of glycolipids containing 5-membered cyclitols.	216
Fig. 4-4. Natural products containing 5-membered cyclitols.	217
Fig. 4-5. Proton NMR spectrum of 917-1-I.	224
Fig. 4-6. Carbon NMR spectrum of 917-1-I.	225
Fig. 4-7. Proton COSY spectrum of 917-1-I.	226

Fig. 4-8. Proton NMR spectrum of 917-1-Q.	227
Fig. 4-9. Carbon NMR spectrum of 917-1-Q.	228
Fig. 4-10. Proton COSY spectrum of 917-1-Q.	229
Fig. 4-11. Proton NMR spectrum of 917-1-R.	230
Fig. 4-12. Carbon NMR spectrum of 917-1-R.	231
Fig. 4-13. Proton COSY spectrum of 917-1-R.	232
Fig. 4-14. Proton NMR spectrum of 917-1-J.	233
Fig. 4-15. Carbon NMR spectrum of 917-1-J.	234
Fig. 4-16. Proton COSY spectrum of 917-1-J.	235
Fig. 4-17. Proton NMR spectrum of 94G-19-A.	236
Fig. 4-18. Carbon NMR spectrum of 94G-19-A.	237
Fig. 4-19. Proton COSY spectrum of 94G-19-A.	238
Fig. 4-20. Proton NMR spectrum of 96X-1-A.	239
Fig. 4-21. Carbon NMR spectrum of 96X-1-A.	240
Fig. 4-22. Proton COSY spectrum of 96X-1-A.	241
Fig. 5-1. Halo formation on PL-plate by B161.	265
Fig. 5-2. GC analysis of fatty acids produced from PLPC by the culture broth of B161.	265
Fig. 5-3. Growth curve of B446 strain in LB, ZoBell, and SWC for the selection of media.	266
Fig. 5-4. Effects of oxygen tension for the growth and SOD activity of B446.	267
Fig. 5-5. The time course of cell mass and SOD activity in 2.0 liter jar fermentor using SWC media.	268
Fig. 5-6. Bio-Scal Q ion exchange chromatography of B348 SOD.	269
Fig. 5-7. Superose 12HR gel filtration chromatography of B348 SOD.	269
Fig. 5-8. Mono-P cation exchange chromatography of B348 SOD.	270
Fig. 5-9. Second Superose 12HR gel filtration chromatography of B348 SOD.	270
Fig. 5-10. SDS-PAGE of purified SOD and molecular weight determination showing 38.0 kD and 22.4 kD band.	271
Fig. 5-11. Chromatogram of SOD by HPLC gel filtration chromatography.	271
Fig. 5-12. Standard curve for Absorbance at 530 nm versus enzyme amount.	272

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that proper record-keeping is essential for transparency and accountability, particularly in the context of public administration and government operations. The text notes that without reliable records, it becomes difficult to track the flow of funds, assess performance, and identify areas for improvement.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used for data collection and analysis. It mentions the use of surveys, interviews, and focus groups to gather qualitative data, as well as the application of statistical software and data visualization techniques to analyze quantitative information. The document stresses the need for a systematic approach to data collection to ensure the validity and reliability of the results.

3. The third part of the document addresses the challenges and limitations of data collection and analysis. It highlights issues such as data quality, bias, and the potential for misinterpretation. The text suggests that researchers should be aware of these challenges and take steps to minimize their impact, such as using multiple data sources and conducting thorough validation procedures.

4. The fourth part of the document discusses the ethical considerations surrounding data collection and analysis. It emphasizes the importance of obtaining informed consent from participants, protecting their privacy, and ensuring that the data is used for legitimate purposes. The text also mentions the need for transparency in the research process and the potential for conflicts of interest.

5. The fifth part of the document provides a summary of the key findings and conclusions. It reiterates the importance of accurate record-keeping and the use of appropriate data collection and analysis methods. The text concludes by noting that while there are challenges and limitations, a systematic and ethical approach to data collection and analysis can provide valuable insights into public administration and government operations.

List of Tables

Table 2-1. Proton and carbon NMR assignments for cladiellin.	10
Table 2-2. Proton and carbon NMR assignments for muricellaxanthin.	15
Table 2-3. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-C.	20
Table 2-4. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-D.	21
Table 2-5. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-E.	25
Table 2-6. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-F.	26
Table 2-7. Proton and carbon NMR assignments for 91K-1-A.	30
Table 2-8. Proton and carbon NMR assignments for 91K-1-B.	33
Table 2-9. Proton and carbon NMR assignments for 91K-1-C.	35
Table 2-10. Proton and carbon NMR assignments for 91K-1-D.	36
Table 5-1. Isolation of marine bacteria and actinomycetes from marine environments.	244
Table 5-2. Screening results for novel enzymes and antibiotic activities.	245
Table 5-3. Purification of PLA ₁ produced by B161 strain.	246
Table 5-4. Purification of SOD produced by B328 strain.	249
Table 5-5. Purification of SOD produced by marine bacterium B446.	249
Table 5-6. Effect of temperature on the SOD activity.	250
Table 5-7. Effect of pH on the SOD activity.	251
Table 5-8. Effect of temperature on the SOD stability.	251
Table 5-9. Effect of pH on the SOD stability.	252
Table 5-10. Effect of some divalent metal ions on the activity of SOD.	252
Table 5-11. Effect of EDTA on the activity of SOD.	252
Table 5-12. Effect of potential inhibitors on the activity of SOD.	253
Table 5-13. Effect of SOD inducer.	253

제 1 장 서 론

지구상에 서식하는 많은 생물은 체내의 생화학적 반응의 결과로 생성된 다양한 대사물질을 함유하고 있다. 이들 천연 유기물질로부터 신물질과 유용물질을 개발하는 연구는 정밀화학과 생명공학의 핵심분야로서 의약품, 신소재등 고부가 가치 산업의 필수 기반 기술이다. 천연물의 산업적 중요성은 현재 시판되고 있는 의약품의 1/3 이상이 천연물이거나 이에 기초한 유도체라는 점에서 단적으로 드러난다. 또한 생물이 생성하는 유기물질에 대한 연구는 유기화학, 생화학, 의·약학, 생물·생태학, 환경학 등 여러 관련분야에 필수적인 정보와 연구의 수단을 제공하여 이들 분야의 기초 및 응용 연구에 미치는 영향이 지대하다.

선진국에서는 1960년대 초부터 해양생물을 신물질과 유용물질의 새로운 원천으로 인식하고 기초 및 응용 연구에 많은 노력을 기울여 왔다. 더욱이 1980년대에 들어서는 오랜 기간 유용물질의 보고 역할을 하여 왔던 육상생물로부터 천연물의 개발이 점차로 정체되어 가는 경향을 보임에 따라 해양생물의 중요성이 더욱 부각되어 집중적인 연구를 하고 있다. 그 결과 상대적으로 짧은 기간에도 불구하고 이미 7,000 이상의 신물질이 발견되었다. 생리활성도 측정 결과 이들중 상당수가 항암, 항바이러스, 항미생물, 효소저해, 면역억제 등 다양한 생리활성 효과를 갖고 있음이 밝혀져 60여 물질이 특허를 획득하여 현재 의약품, 건강보조제, 화장품 등으로 개발중이며 pseudopterosins등은 이미 상업화에 성공하였다.

분자량 2,000 이하의 소형 유기물질-좁은 의미의 천연물-이외에 거대물질과 유용효소에 대한 연구도 매우 활발하여 갑각류의 외피에 다량으로 존재하는 다당체 chitosan은 다양한 활용 가능성으로 인하여 21세기의 신물질으로 불리우며 인공 플라스틱 뿐만아니라 생리활성물질로의 산업적 개발 가능성이 모색되고 있다. 기능성 당단백질과 고성능 접착제등에 대해서도 많은 연구 결과가 발표되었다. 또한 홍조류를 비롯한 여러 해양생물에 존재하는 haloperoxidase는 장기간의 연구에 의하여 최근 그 실체가 규명되어 대량생산 방안이 연구중에 있다.

이와 같이 해양생물 유래 신물질과 유용물질에 대한 연구는 양적, 질적인 면에서 급속히 발전하고 있어서 관련 산·학계에서는 해양생물이 가까운 시일에 육상생물에 버금가는 유용물질의 보고로 등장할 것으로 예측하고 있다. 현재 외국에서 천연물 연구의 대상 생물은 대형 해조류와 저서군체 동물로부터 미생물에 이르기까지 거의 모든 해양생물을 망라하고 있으며 연구 대상 지역은 열대에서 남, 북극등 극한지까지 전세계의 모든 해역을 포함하고 있다. 또한 연구 대상 생물의 서식지도 조간대나 상부 조하대로부터 수 천미터 깊이의 심해 퇴적층에 이르는 모든 해양 환경이 망라되어 있다.

전기한 바와 같이 선진국에서는 해양생물 유래 신물질 및 유용물질에 대한 연구가 이미 산업화의 초기단계에 진입하여 있으며 공공 연구기관이나 거대기업을 중심으로 산·학·연 협동으로 집중적인 연구를 하고 있다. 최근에는 중국, 인도, 파키스탄, 칠레 등 개도국에서도 상당한 연구결과가 보고되고 있다. 이에따라 미래에 개발 가능한 해양자원-식량이 아닌 신물질의

원천으로서-확보의 측면에서 자국의 연안생물에 대한 배타적 보호주의를 표방하는 국가가 급증하고 있다. 이미 호주와 ASEAN 국가등에서는 외국 연구기관의 자국 근해 접근을 원천적으로 봉쇄하고 있는 실정이며 미국, 일본등 선진국에서는 외국의 영해에 진입하기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다.

반면 국내에서는 다양한 해양환경에 따른 무수한 생물이 근해에 서식함에도 불구하고 해양천연물에 대한 연구가 대단히 미진한 상태이다. 국내의 천연물 연구의 전반적인 수준이 선진국에 비하여 상당한 격차를 나타낼 뿐만 아니라 관련분야 연구진의 관심이 신동의약등 전통 약용식물과 토양미생물등 육상생물에만 집중되어 있어서 해양생물은 거의 주목을 받지 못하고 있는 실정이다. 단기간의 연구 성과에 주력하는 국내 관련 산업계의 현실 때문에 산업화를 위해서 많은 연구 노력이 필요한 해양천연물은 도외시되고 있다. 그러나 해양천연물이 갖고 있는 막대한 학문적·산업적 잠재력을 고려할 때 근년에 대두한 국가간의 생물자원 확보 경쟁과 더불어 국내에서 이 분야의 연구는 대단히 시급하다.

본 연구진에서는 지난 수 년간 장기적인 해양 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기반조성의 일환으로서 천연물에 대한 데이터 베이스의 구축, 해양미생물의 분리 및 보존방법의 개발 등의 기초연구를 수행하였으며 우리나라 근해에 서식하는 수 종의 저서균체 동물로부터 항바이러스, 세포독성, 효소저해 등 다양한 생리활성 효과를 가진 20여 천연물을 분리하여 구조를 보고한 바 있다. 또한 건강 보조 물질로 유명한 EPA를 생산하는 해양미생물 균주를 다수 분리하여 대량생산 방안을 제시하였다. 이와 같은 연구결과는 국내에서도 해양 천연물 연구의 가능성이 있음을 입증한 것이다.

본 연구진에 의하여 이루어진 기존의 연구결과를 기초로 하여 본 장기 연구과제인 해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구에서는 해양 동식물과 미생물로부터 생리활성 신물질, 효소 및 거대물질들을 분리하여 구조결정과 생화학적 분석을 완료하고 다양한 생리활성도 측정을 거쳐 산업적 이용 가능성이 큰 물질에 대한 대량생산 방안을 제시하는 것을 중요 목표로 하였다. 또한 이 과정에서 해양미생물의 효과적 배양 및 보존 기술과 생리활성 검색 기술의 개발 연구를 함께 수행할 예정이다.

연구대상 천연물은 분자량 2,000 이하의 소형 유기물질과 당단백질, 다당류 등 거대물질, 그리고 haloperoxidase, superoxide dismutase, phospholipase 등의 유용효소이며 생리활성도는 세포독성, 항바이러스, 효소저해, 항미생물 효과 등을 중점적으로 측정할 예정이다. 연구대상 생물은 해면, 강장, 원색 등 저서 균체동물과 방선균을 비롯한 해양미생물이 주요 대상이며 점차적으로 적조플랑크톤등 단세포조류와 기타의 해양동식물로 확장할 예정이다. 저서 균체동물은 지난 10여년간 해양천연물 연구를 주도하여 온 생물로서 현재 신물질의 70% 이상이 이들로부터 발견되고 있으며 향후에도 상당기간 해양천연물 연구에 있어서 중심 연구대상의 역할을 할 것으로 예측된다. 본 연구진에서 수행한 기초연구에서도 우리나라 근해에 서식하는 저서 균체동물의 천연물 연구가치가 매우 높은 것을 확인한 바 있다. 방선균등 미생물은 현재까지 해양천연물에서 차지하는 위치가 미미하나 향후의 신물질 개발 가능성이 매우 높은 생물로 예측된다.

토양 방선균, 진균 등 미생물이 생리활성 천연물의 보고라는 것은 육상의 경우에서 명백히 입증되었다. 해양환경에서도 다양한 미생물이 서식하고 있으며 이들 중 상당수가 고유한 해양미생물이거나 염분, 수압 등의 해양환경에 생화학적으로 적응한 종들이므로 기존의 육상천연물과는 구조적으로 판이한 신물질을 생산할 가능성이 매우 높다. 또한 해양 균체동물에서 분리된 생리활성물질의 상당수가 공생미생물이 생산한 것으로 추측되고 있어서 이들을 효과적으로 분리, 대량 배양할 경우 현재 해양천연물의 산업화를 저해하는 가장 큰 요소인 물질의 대량 확보가 가능하게 될 것이다. 적조 플랑크톤은 생리활성 신물질 뿐만 아니라 환경화학적 측면에서도 연구 가치가 큰 생물이나 효과적인 보존 및 대량 배양방법의 개발등 천연물 연구에 선행되어야 할 생물학적 문제점이 많아 제 2단계에서 본격적으로 연구할 예정이다. 본 연구를 위한 생물의 채집 지역은 우리나라와 남극연안이 주된 연구대상이며 국제 협력체계의 수립을 통하여 열대 서부 태평양등 외국의 해역으로 점차 확장할 계획이다.

본 제1단계의 연구목표는 기반기술의 확립으로서 중점 연구내용은 외국의 기존 연구결과의 분석, 연구대상 생물시료의 확보, 생리활성 탐색방법의 확립등 장기적이고 체계적인 연구를 위한 기반을 확충하고 조추출물에 대한 생리활성도 측정에 의한 중점 연구대상 생물 시료의 선정, 이들로부터 20종 이상의 신물질 분리, 구조결정 및 생리활성도 측정, 해양미생물 균주의 분리 및 보존, 이들에 대한 생리활성 스크리닝에 의한 유용균주의 선정 및 배양, 유용물질의 분리 정제 및 생화학적 특성파악등이다. 이와 아울러 기존 생리활성 측정방법의 문제점을 개선한 새로운 측정방법의 개발도 함께 시도하였다.

보고서로 기 제출한 제 1차년도의 연구결과를 간략히 요약하면 먼저 본 연구에서 중점적으로 취급할 생리활성도 중의 하나인 항암효과 측정 체계의 확립을 위하여 기존의 항암 및 암기작 관련 효소의 저해도 측정방법과 해당 생리활성 물질에 관한 자료를 수집, 분석하였다. 연구대상 생물 시료의 확보를 위하여 남해안의 거문도, 거제도 및 제주도 해역에서 58종의 저서 균체동물 시료를 채집하였다. 이들 시료로부터 유기용매를 가하여 얻은 조추출물에 대한 생리활성도 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 6종의 강장동물과 3종의 해면동물을 중점연구 대상으로 선정하여 천연물을 탐색한 결과 10종의 신물질을 비롯한 18종의 천연물이 분리되어 구조결정을 완료하고 생리활성을 측정하였다. 또한 해양미생물로부터 신물질과 유용물질을 개발하기 위한 기초 연구로서 우리나라 근해, 동해와 태평양 심해저, 남극연안 등지로부터 1,500여 해양세균과 150여 방선균 균주를 분리하였으며 세포독성, 효소저해, 항균 및 항진균 검색결과 활성이 우수한 균주를 다수 선별하였다. 또한 거대물질과 신효소계의 개발을 위하여 lipase, haloperoxidase 등 4종의 유용효소에 대한 활성 측정방법을 개발하였으며 전기한 미생물을 대상으로 한 검색결과가 우수한 균주를 선정하였다.

제 1차년도의 연구 결과를 기초로 하여 본 제 2, 3차년도에서는 우리나라 근해의 저서동물에 대한 신물질연구를 중점적으로 수행하였다. 그 결과 남해안에 서식하는 gorgonians, hydroids, sponges 등으로부터 22종의 신물질을 포함하는 30여종의 천연물을 분리하여 구조결정과 생리활성 측정을 완료하였다. 이 연구결과는 본 보고서의 제 2-4장에서 생물의 분류군에

따라 다루었다. 다양한 해양환경으로부터 2,000여 방선균을 포함하는 7,000여 해양미생물 균주를 새로이 분리하였으며 이들 중 항진균과 효소활성이 우수한 균주를 선별하였다. 선정된 균주로부터 SOD, PLA₁ 등 유용효소를 순수하게 분리하여 생화학적 특성을 파악하였다. 자세한 연구결과는 제 5장에 보고하였다. 또한 효소저해 활성등 수 중의 생리활성 검색방법을 확립하였으며 발광미생물을 이용한 신규 검색방법을 개발하였다. 이 연구결과는 제 6장에서 다루었다. 마지막으로 천연물에 대한 항바이러스 효과의 측정은 고도의 전문성이 요구되므로 이 분야에 있어서 국내 유수의 전문 연구기관인 화학연구소 스크리닝센터에 연구를 위탁하였으며 연구결과는 본 보고서의 말미에 별도로 수록하였다.

제 2 장 Gorgonians의 대사물질

2. 1. 서론

Gorgonians는 Anthozoa아문 Alcyonaria강 Gorgonacea목에 속하며 대서양 특히 Carribean Sea의 얇은 해역에 대단히 번성하고 있다. 그러나 이들은 태평양에서는 상대적으로 드물게 발견된다. Gorgonians는 soft corals(Alcyonacea목)와 함께 강장동물의 천연물의 양대산맥을 형성하고 있으며 분리된 천연물의 대부분은 terpenoids 혹은 terpene part를 가진 mixed biosynthetic products이다(Ireland *et al*, 1988; Faulkner, 1996). 이들의 골격은 지극히 다양하나 cembrane골격을 갖고 있는 diterpenoids가 다수를 차지한다.

Gorgonians와 soft corals간에는 천연물의 구조와 추출빈도에 있어서 뚜렷한 구분이 없으며 거의 모든 terpenoids의 탄소골격이나 작용기의 종류 및 위치에 있어서도 양 분류군이 거의 일치하고 있다. 한 종류의 생물에서만 발견되는 특이한 골격을 가진 terpenoids도 소수 발견되고 있으나 이는 양 분류군의 전체적인 차이보다는 해당속(genus)이나 종(species)에 국한된 현상으로 이해된다. Terpenoids 이외에도 특이한 작용기를 가진 steroids가 상당수 발견되었으며 prostanoids를 포함하는 unusual polyketides나 lipids part를 가진 mixed biosynthetic products도 드물지 않게 발견되고 있다(Faulkner, 1996).

강장동물 특히 gorgonians의 대사물질에 관한 가장 큰 논란은 천연물의 생산 주체에 대한 것이다. 대부분의 다른 강장동물들과 마찬가지로 육식성임에도 불구하고 gorgonians의 상당수는 세포내에 공생 해조류(zooxanthellae)를 포함하고 있다. 이 단세포 식물들은 쌍편모조류(dinoflagellates)와 유사한 영양번식(vegetative stage)을 하며 직경 8-12 μm 의 미세한 구형입자로 나타난다. 이들은 동물의 조직속에서 대단히 풍부하여 동물조직 1 mm^3 당 30,000개의 해조류가 발견된 적도 있다. 공생해조류(zooxanthellae)는 강장동물의 조직에서 대단히 유사한 포낭체를 형성하기 때문에 고전적인 형태학적인 기준에 의하여 분류할 수가 없다. 그래서 어떤 분류학자들은 강장동물에서 발견되는 모든 zooxanthellae는 같은 종 즉 *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal = *Gymnodinium microadriaticum* Freudenthal로 분류하고 있다. 그러나 일부에서는 이들의 strain에 따른 숙주의 선택성을 이유로하여 모든 zooxanthellae를 동일 분류군으로 취급하는 것에 의문을 제기하고 있다.

Zooxanthellae는 강장동물뿐만 아니라 해면, 연체동물등 다른 해양동물에서도 존재한다. 그러나 이들은 큰 생태학적 중요성에도 불구하고 연구가 많이 이루어지지 않았다. 현재까지 진행된 연구결과를 종합하면 공생생물과 숙주간에 중요한 대사경로의 교환이 있다는 사실이 확인되었고 큰 대합조개인 *Tridacna* species의 경우처럼 강장동물은 그들의 공생 해조류를 먹을 수도 있다는 사실도 발견되었다. 이들 zooxanthellae의 광합성 작용은 산호초의 에너지 평형에 대단히 중요하다는 것이 증명되었다. 사실 적도 지역에 존재하는 산호초가 맑은 천해에 존재하는 이유는 이용

할 수 있는 빛의 양 때문이며 이것 역시 단세포 조류와 강장동물의 공생관계를 위해서 라고 할 수 있다.

공생 해조류를 가지고 있는 강장동물의 대부분이 많은 양의 2차 대사물질들을 생성함이 밝혀짐에 따라 필연적으로 대사물질의 진정한 생산주체가 무엇인가 하는 의문을 제기하였다. 이 문제를 해결하기 위하여 각각의 대사물질의 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 값을 측정한 결과 steroids는 그 구조에 따라 zooxanthellae나 강장동물중의 어느 하나가 생산하고 terpenoids는 숙주에 의해서만 생산되는 강장동물의 고유한 2차 대사물질이라는 사실이 결정되었다(Faulkner, 1988). 그러나 최근 탄소동위원소 측정방법의 오차 및 적용한계에 대한 의문이 제기됨에 따라 이 논쟁이 완벽히 결론지어진 것은 아니다(Faulkner, 1996).

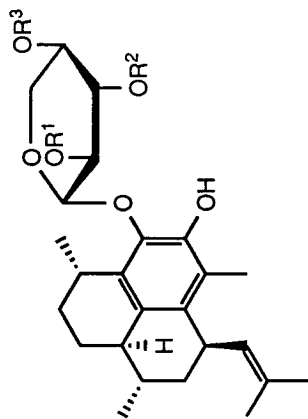
현재까지 구조가 결정된 해양천연물중 약 25%가 강장동물 특히 gorgonians와 soft corals로부터 얻어 졌다. 이는 전 해양천연물 중 해면동물에 다음가는 추출빈도이다. 또한 gorgonians의 대사물질중 많은 수가 강력한 생리활성도를 보유함이 확인되었다. 특히 카리브해에 서식하는 *Pseudoterogorgia elisabethae*로부터 추출된 amphilectene계 diterpene glycosides인 pseudopterosins은 물질특허를 획득하여 소염 및 진통제로의 개발중에 있으며 기능성 화장품으로 이미 시판 중에 있다. 한편 태평양에 서식하는 gorgonian인 *Lophogorgia* spp.에서 추출된 cembrane계 diterpenoid인 lophotoxin은 신경세포의 acetylcholine receptor의 구조연구와 Alzheimer병의 연구용 시약으로 이용되고 있다(Fig. 2-1, Fautin, 1988).

2. 2. *Muricella* species의 대사물질

1995년 9월에 우리 나라의 제주도 서귀포시 연안해역인 섯섬 및 문섬 그리고 범섬 근처에서 gorgonian *Muricella* species 2종을 각각 5 kg 채집하였다. 이들은 모두 군체의 색깔이 진한 붉은색을 띄었으며 모양은 일반적인 관목형태의 gorgonian이었으며 두 종류가 형태학적으로나 상당히 유사하였다. 하지만 조추출물을 이용한 TLC 상의 분류에서 나타나는 chromatogram이 뚜렷한 차이점을 보였다. 따라서 채집된 모든 시료에 대하여 TLC 분석을 하여 이들을 두 그룹 즉 95J-16와 95J-18로 분류하였다(Shin and Fenical, 1993). 이 gorgonian들의 최종적인 분류는 국내 분류 전문가에 의하여 같은 속에 속하는 다른 종으로 분류되었다(Seo *et al*, 1995; 1996).

그늘에서 말린 후 냉동보관하였던 5 kg의 시료(시료번호 95J-16과 95J-18)를 methylene chloride로 반복해서 추출한 후에 다시 methanol로 반복하여 추출하였다. 추출용매 methylene chloride와 methanol에 의해 얻어진 각각의 조추출물들에 대한 ^1H NMR 분석을 한 결과 흥미있는 물질의 존재가 발견되었으며 brine shrimp lethality 측정의 결과(LC_{50} 95J-16, 152 ppm; 95J-18, 210 ppm)도 우수하였다.

먼저 95J-16의 경우에 methylene chloride층의 조추출물들이 상당한 brine shrimp lethality를 보였으며 ^1H NMR상에서도 olefinic region에 흥미 있는 peak들을 보였다. 그러나 methanol 추출액은 brine shrimp에 대한 독성이 거의 없었고 ($\text{LC}_{50} > 1,000$ ppm) ^1H NMR상에서도 fatty



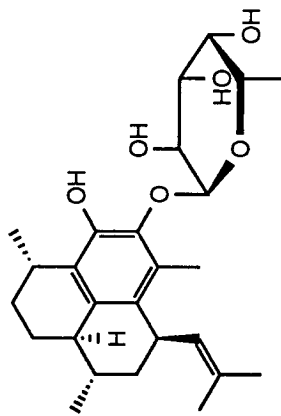
pseudopterosin A : $R^1 = R^2 = R^3 = H$

B : $R^1 = Ac, R^2 = R^3 = H$

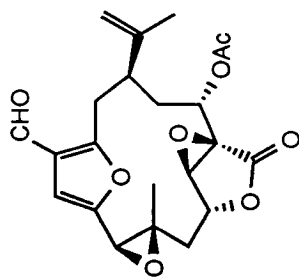
C : $R^1 = R^3 = H, R^2 = Ac$

D : $R^1 = R^2 = H, R^3 = Ac$

pseudopterosins - antiinflammatory, analgesic.
(*Pseudopteroorgia elisabethae*)



pseudopterosin E



lophotoxin - binds to
acetylcholine receptor
(*Lophogorgia* spp.)

Fig. 2-1. Structures of pseudopterosins and lophotoxin.

acid만 관찰되었다. 따라서 methylene chloride층에서 추출된 조추출물에 대한 silica vacuum flash chromatography를 실시하였으며 용리용매는 100% hexane에서 10% 간격으로 EtOAc를 첨가하여 만든 혼합용매를 사용하였다. 이렇게 하여 얻어진 각각의 분획에 대해 ^1H NMR을 측정한 결과 비극성 분획(10%-20% EtOAc/hexane)층과 상당히 극성인 80%EtOAc/hexane층에서 흥미 있는 peak들이 발견되었다.

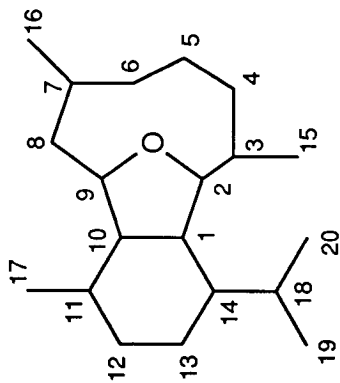
Vacuum flash chromatography에 의해 분리된 분획 10%와 20% EtOAc/hexane층을 합한 후에 Sephadex LH 20 column chromatography로 steroids와 fatty acids등을 제거하고 semi-prep silica HPLC로 일차 분리를 하였으며 최종적으로는 reversed-phase HPLC로 diterpene인 95J-16-A를 순수하게 얻을 수 있었다(Fig. 2-2).

이 물질의 ^1H NMR 스펙트럼은 이미 본 연구팀에서 분리하여 보고한 diterpene 유도체 muricellin과 매우 유사하였기 때문에 동일한 계열의 물질로 추정되었다(Fig. 2-9, 해양연구소, 1995). 그러나 의외로 ^{13}C NMR스펙트럼 상에서 나타난 탄소 peak의 수가 15-16개로서 도저히 diterpene 유도체와 맞지 않았을 뿐만 아니라 여러 peak의 모양이 매우 broad 하였다. 이 문제를 해결하기 위하여 측정변수 중 delay time를 일반적인 값(1 - 1.5 초)보다 상당히 길게하여 (5 초) 측정하였으나 나타난 peak의 갯수는 여전 하였다. 따라서 제안된 또 한 가지의 가능성은 이 물질에 존재하는 ring의 flip이 너무 빨라서 NMR에서 측정할 수 있는 시간 영역을 벗어 나기 때문에 탄소 peak가 제대로 나타나지 않은 것으로 생각되었다. 이런 가능성을 확인하기 위하여 ring flip을 감소시킬 수 있는 저온 실험을 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 수행하였으며 그 결과 정확한 ^{13}C NMR 신호들이 발견되었다(Fig. 2-10).

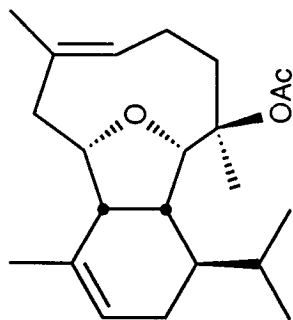
이 물질의 전체적인 구조는 ^1H COSY와 HMQC 그리고 HMBC에 의해서 결정되었으며 1차년도에 보고하였던 muricellin(92J-18-G)의 구조와 매우 유사하였다(Fig. 2-2, Table 2-1, Shin *et al*, 1995). 구조상의 유일한 차이점은 이중결합이 muricellin에서는 C-11과 C-12 사이에 존재하는 반면에 95J-16-A에서는 C-11과 C-17 사이에 존재한다는 것이었다. 구조적인 관점에서 보면 이 두 물질은 동일한 cyclohexene ring에서 이중결합의 위치만 endo(92J-18-G)와 exo(95J-16-A)로 차이가 날 뿐 나머지는 완전 동일함에도 불구하고 NMR실험에서는 매우 다른 조건을 필요로 하였다. 이는 분자 운동이란 측면에서 매우 흥미있는 현상이라 생각되며 여기에 관한 연구가 더 진행될 예정이다.

문헌조사 결과 95J-16-A는 Kazlauskas 등에 의하여 호주 근해의 soft coral *Cladiella* 속으로부터 이전에 분리되었던 cladiellin으로 확인되었다. 그러나 당초의 보고에는 자세한 ^1H 와 ^{13}C NMR 데이터는 언급되지 않았으며 전체적인 구조는 X-ray 결정구조 방법으로 이루어 졌다 (Kazlauskas *et al*, 1977). 자세한 NMR 데이터가 보고되지 않은 이유는 아마 위와 같은 현상 때문에 의한 것이 아닌가 여겨진다. 이 물질과 함께 본 연구팀에서 이전에 분리한 cladiellin 유도체 들인 astrogorgin, ophirin, calicophirin, muricellin들의 brine shrimp lethality를 측정한 결과 LD₅₀이 각각 1.3, 1.8, 8.7, 1.0, 0.3 ppm로 나타났다(해양연구소, 1995).

진한 선흥색깔을 띠는 무정형 고체 muricellaxanthin(95J-16-B)이 silica vacuum flash



cladiellin (95J-16-A)



muricellin (92J-18-8)

Fig. 2-2. Cladiellin derivatives isolated from gorgonians of the genus *Muricella*.

Table 2-1. Proton and carbon NMR assignments for cladiellin.

	H	C
1	2.15 (1H, dd, 11.8, 6.8)	47.97 d
2	3.70 (1H, br s)	91.96 d
3		86.71 s
4		37.35 t
5	2.09 (1H, m)	26.37 t
6	5.47 (1H, br s)	133.11 d
7		124.09 s
8	2.35 (1H, dd, 13.7, 5.3)	38.66 t
	2.02-1.97 (1H, m)	
9	3.98 (1H, br s)	79.57 d
10	3.04 (1H, m)	48.69 d
11		147.56 s
12	2.26 (1H, ddd, 13.7, 3.4, 3.4)	31.47 t
	2.18 (1H, br ² d, 13.7)	
13	1.75 (1H, dddd, 12.9, 3.4, 3.4, 3.4)	25.70 t
	1.01 (1H, ddd, 12.9, 12.9, 3.4)	
14	1.33 (1H, br dd, 12.2, 12.2)	42.05 d
15	1.44 (3H, br s)	24.99 q
16	3.75 (3H, s)	21.94 q
17	4.80 (1H, br s), 4.77 (1H, br s)	110.70 t
18	1.93-1.87 (1H, m)	28.59 d
19	0.77 (3H, d, 6.9)	15.56 q
20	0.97 (3H, d, 6.9)	22.25 q
21		170.47 s
22	2.05 (3H, s)	22.75 q

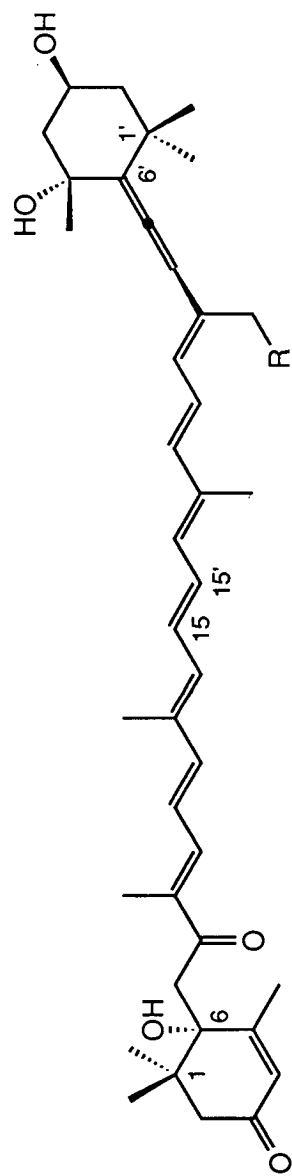
Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

chromatography의 80%EtOAc/hexane 분획으로부터 reversed-phase HPLC에 의해 분리되었다 (Fig. 2-3). 이 물질의 분자식은 고성능 분별 질량분석(HRFABMS) 데이터와 ^{13}C NMR로부터 $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{O}_7$ 으로 결정되었다(Fig. 2-12). 이 물질은 전체적인 탄소의 개수와 ^1H 와 ^{13}C NMR spectrum의 olefinic 영역(δ 150-110, 7.0-5.0)에 나타난 다수의 peak들 그리고 분리된 물질의 색깔이 진한 선홍색을 지니고 있다는 점 등에 의해서 carotenoid계열의 물질로 추측되었다(Fig. 2-11). 뿐만 아니라 IR spectrum상에서는 1940cm^{-1} 에 나타난 강한 흡수선으로부터 allenic group을 예측할 수 있었고 그 외 3400 , 1750 , 1670 cm^{-1} 에서 나타나는 흡수밴드에 의해서 hydroxy, ester, unsaturated ketone 작용기가 각각 들어있다는 것을 확인할 수 있었다.

Muricellaxantin의 구조는 ^1H COSY, HMQC 및 HMBC에 의해서 결정될 수 있었다(Fig. 2-13 ~ 2-16). 먼저 수소를 갖는 모든 탄소와 그 탄소에 붙어 있는 수소들을 HMQC 실험으로부터 정확히 연결시킬 수 있었다(Table 2-2, Fig. 2-14). ^1H COSY spectrum에서 δ 1.90에 있는 methyl 수소와 δ 5.83 ppm에 있는 olefinic proton과의 correlation은 long-range coupling(J_{vs})에 해당된다고 볼 수 있으며 이는 전형적인 allylic coupling으로 해석되었다(Fig. 2-13). 이러한 해석은 HMBC 실험에서 vinyl methyl protons(δ 1.90)와 olefinic 영역에 존재하는 carbons(δ 167.90, 125.97)과의 correlation에 의해서도 증명되었다. 그리고 olefinic 영역에서 나타난 탄소들의 chemical shift 값이 차이(42 ppm)가 많이 나는데 이것은 electron-withdrawing group이 한쪽에 붙어 있으므로 인해 생겨난 것으로 볼 수 있다. 따라서 이 물질은 α, β -unsaturated carbonyl group을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

Carbonyl carbon 주변의 부분구조는 HMBC 실험에 의해서 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexenone으로 결정되었다. 즉 carbonyl carbon에 바로 인접한 methylene protons(δ 2.47과 2.33)과 주변의 methyl protons(δ 1.08과 1.05)이 이 부분구조를 구성하는 여러 carbons과의 long-range correlation을 보여 주었다(Fig. 2-15). 동일한 방법으로 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -unsaturated carbonyl group이 존재한다는 것을 2-D NMR 실험으로부터 결정할 수 있었다. 이 두 부분구조는 역시 HMBC 실험에서 methylene 수소들(δ 3.05와 2.93)이 cyclohexenone part의 C-1, C-4, C-6위치에 있는 탄소들(δ 42.02, 167.93, 78.54)과 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -unsaturated carbonyl carbon(δ 203.47) 사이에 long-range coupling을 하고 있음이 뚜렷이 관찰되었기 결국 Fig. 2-4의 a와 같은 구조로 결정되었다.

또 다른 6-membered ring의 존재가 여러 가지 2-D NMR 실험에 의하여 결정되었다. 먼저 ^1H COSY 실험에 의하여 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ 와 같은 spin system이 존재함이 확인되었으며 HMBC 실험에서 위의 두 methylene 탄소들과 δ 118.52에 위치한 olefinic 탄소가 δ 1.38, 1.34, 1.09에 나타난 세 methyl 수소들과 long-range correlation을 가지는 것이 발견되어 이들이 전체적으로 6-membered ring을 형성하고 있음을 말해주고 있다. 그리고 동일한 실험에 의하여 δ 118.52에 나타난 탄소와 이보다 훨씬 downfield인 δ 201.75에 위치한 탄소가 δ 6.04의 수소와 coupling을 하고 있음이 발견되었다(Fig. 2-16). 이러한 chemical shift 값을 나타내는 수소 및 탄소들 사이에 존재하는 특이한 coupling 형태로 보아 allenic functionality가 존재함을 알 수 있다.



muricellaxanthin (95J-16-B: R = OAc)

amarouciaxanthin A (R = H)

Fig. 2-3. Structures of muricellaxanthin and amarouciaxanthin A.

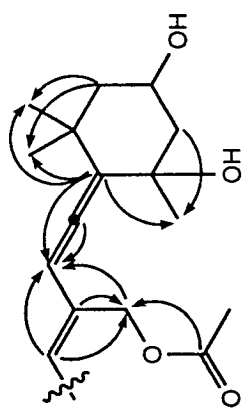
이 allenic group과 연결된 주위 환경은 δ 6.04의 수소와 δ 132.86, 59.46에 있는 탄소들과 long-range coupling을 통해서 예측할 수 있었는데 δ 59.46에 나타난 methylene 탄소에 붙은 두 수소가 downfield(δ 4.91, 4.75)에 나타나고 이는 다시 acetoxy carbonyl 탄소와 long-range coupling을 한다는 점에서 acetoxy group이 methylene에 붙어 있음을 알 수 있었다. 그러므로 이 6-membered ring을 갖는 group의 부분적인 구조는 Fig. 2-4의 b와 같다.

나머지 남은 chain 부분은 4개의 이중결합이 2개의 vinyl methyl group으로 구성되어져 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-4-c). 그러나 NMR 상에서 수소와 탄소 signal들이 심하게 중복되어져 있어 이들에 대해서 정확한 assign을 하는 데 어려움이 있었다. 따라서 유사한 화합물에 대한 ^{13}C NMR 데이터와의 비교로부터 이들 문제를 해결하였다(Moss, 1976). 이와 같이 하여 muricellaxanthin의 구조가 allene 그룹을 갖는 carotenoid라고 명확하게 결정되었다. 문헌 조사 결과 muricellaxanthin은 일본 근해의 tunicate *Amaroucium pliciferum*에서 분리된 amarouciaxanthin A과 acetoxy methylene group을 제외하고는 매우 유사하였다(Fig. 2-3, Table 2-2, Matsuno *et al*, 1985). 이 group을 제외한 다른 부분에 대한 스펙트럼 데이터를 비교한 결과 muricellaxanthin과 amarouciaxanthin A가 서로 잘 일치하고 있음을 볼 수 있었다.

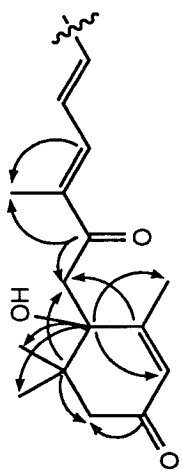
Muricellaxanthin은 C-6, C-3', C-5'와 allene group에 asymmetric 탄소를 갖고 있다. 이들의 입체배열은 NMR과 CD(circular dichroic) 측정에 의하여 결정되었다. 먼저 ^1H NMR에서 H-3'의 coupling constant($W_{1/2}$)가 28 Hz 정도의 큰 값을 갖는 점으로 보아 이 수소는 cyclohexane ring에 대하여 axial 방향으로 접합되어 있음이 분명하였다. NOESY 실험에서도 H-3'와 인근에 위치한 H-2' β , H-4' β 그리고 H-16'와의 강한 correlation을 보여주고 있으므로 H-3'의 orientation이 axial임을 알 수 있었다. 따라서 C-3'와 -5'의 relative orientation은 각각 3' S^* 와 5' R^* 이다. 그러나 C-6와 allene의 stereochemistry는 asymmetric 탄소와 인근 수소와 거리가 멀리 떨어져 있어 일반적인 NMR 방법으로 결정될 수 없었다. 이 탄소들에 대한 relative configuration과 분자 전체에 대한 absolute stereochemistry는 CD data를 얻어 이들 값을 유사한 물질인 amarouciaxanthin A의 CD data와 비교하여 알아내었다(Matsuno *et al*, 1985). CD data가 위 물질과 매우 유사하다는 사실로부터 이 화합물의 stereochemistry는 (6*S*, 3'*S*, 5'*R*, 6'*R*)-19'-acetoxy-6,3',5'-trihydroxy-4,5,6,7'-tetrahydro-7,8,5',6'-tetrahydro- β,β -carotene-3,8-dione이라고 결론을 내릴 수 있었다.

Amarouciaxanthins와 halocynthiaxanthin을 포함한 변형된 carotenoid들은 cancer cell-line에 대해서 cytotoxicity를 보여준다고 알려져 있다(Matsuno *et al*, 1985). 본 연구팀에서 생리 활성도를 측정한 결과, muricellaxanthin이 역시 brine-shrimp larvae에 대해서 큰 독성(LC₅₀ 0.16 ppm)을 갖고 있음을 보여주었다.

Carotenoids는 보통 노란색에서 붉은 색 계통의 색깔을 보여 주며 lycopene에서 유래된 isoprenoid polyene 색소이다. 모든 carotenoids는 빛, 산소, 열, 산, 그리고 과산화물에 불안정하며 fucoxanthin과 peridinin은 염기에도 불안정하다. Carotenoids는 자연계에서 많은 기능을 가지고 있으나 아직까지 완벽하게 알려져 있지 못하다. 이 물질의 가장 대표적인 기능은 photoprotection



(a) keto end



(b) allenic end



(c) polyene chain

Fig. 2-4. Partial structures and key HMBC correlations of muricellaxanthin.

Table 2-2. Proton and carbon NMR assignments for muricellaxanthin.

#	H	C	#	H	C
1		42.02	1'		36.06
2	2.47, 2.33, AB	49.71	2'	1.92, m. 1.29, dd, 14.4, 12.4	49.43
3		197.67	3'	4.30, m	64.26
4	5.83, br s	125.97	4'	2.26, br dd, 12.9, 4.3, 1.32	48.96
5		167.93	5'		73.01
6		78.54	6'		118.52
7	3.05, 2.93, AB	38.64	7'		201.75
8		203.47	8'	6.04, s	100.83
9		135.06	9'		129.64
10	7.10, br s, 11.2	142.11	10'	6.30, d, 11.5	132.86
11	6.58, dd, 14.7, 11.2	123.25	11'	6.70, m	124.66
12	6.70, m	146.96	12'	6.42, d, 14.9	139.89
13		135.65	13'		138.23
14	6.46, br d, 11.7	137.80	14'	6.31, br d, 11.5	133.45
15	6.66, dd, 14.2, 11.7	130.04	15'	6.77, dd, 14.5, 11.5	133.01
16	1.08, s	23.24	16'	1.34, s	29.17
17	1.05, s	24.86	17'	1.09, s	31.89
18	1.90, d, 1.4	20.75	18'	1.38, s	31.02
19	1.95, br s	11.65	19	4.81, 4.75, AB	59.46
20	1.99, br s	12.97	20'	1.99, br s	12.71
			Ac		170.85
				2.05, s	21.08

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

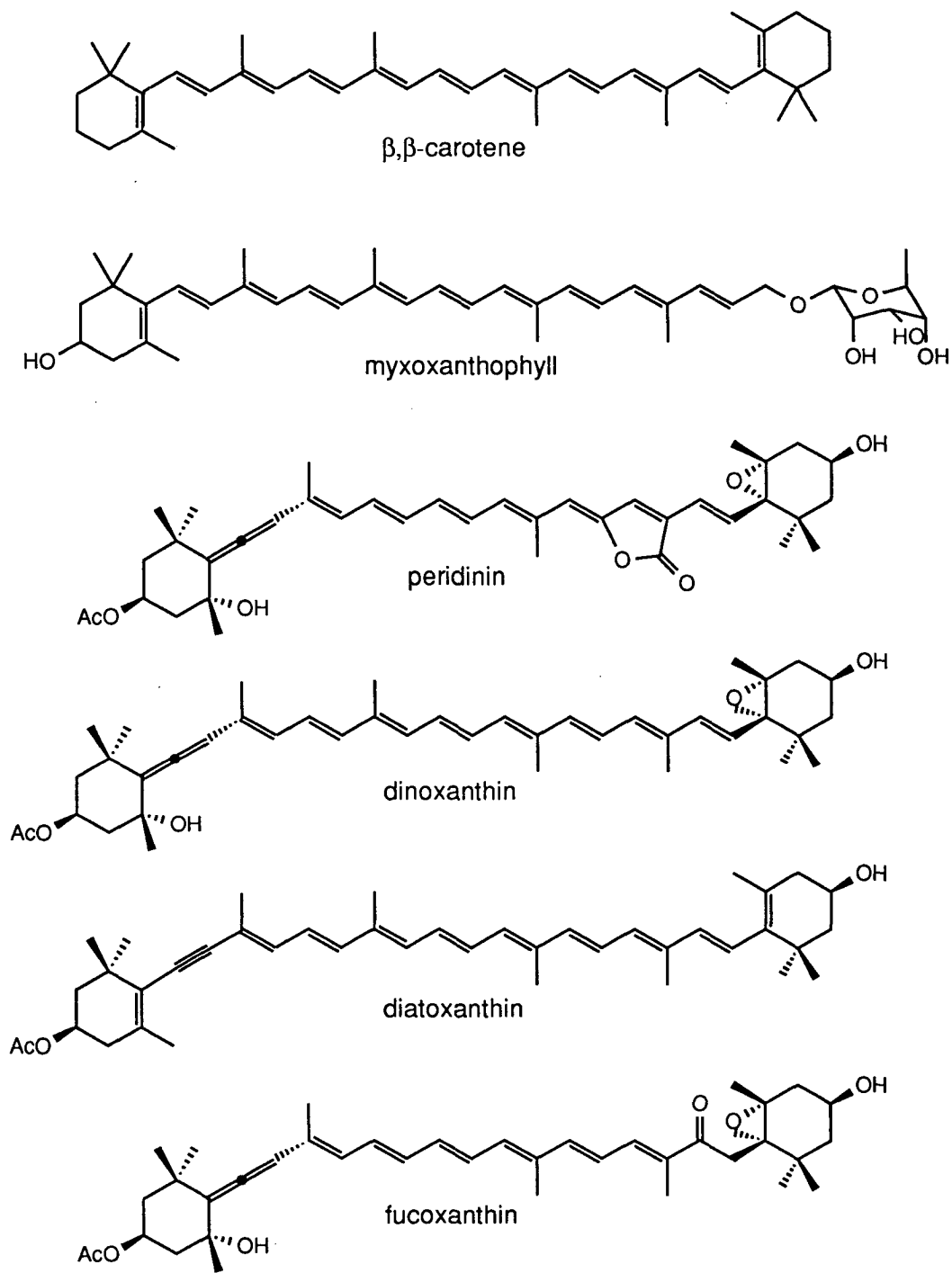


Fig. 2-5. Carotenoids isolated from marine algae.

으로서 빛에 의해서 여기된 chlorophyll과 triplet oxygen으로부터 생성된 singlet oxygen을 제거한다(Liaaen-Jensen, 1978).

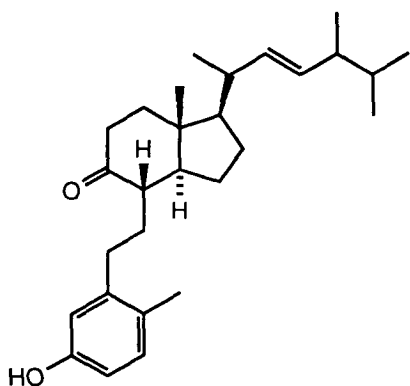
Carotenoids는 해양에서 추출된 천연물들중에 가장 초기부터 주목을 끌어 왔다. 이들은 해양 환경에서 박테리아, 효모, 진균류에서도 가끔 발견되며 여러 종류의 척추 및 무척추동물에도 존재한다. 특히 해양식물에 다량으로 존재하고 있으며 엽록소에 의한 광합성을 돕는 기능을 수행한다. 이들의 구조상의 특징은 7-11개의 탄소 이중결합이 서로 conjugated되어 연결되어 있다는 점이다. 이 이중결합의 수에 의하여 흡수하는 빛의 파장이 결정되며 각각의 pigment는 고유한 색깔을 띄게 된다. 그러므로 해양식물은 광합성의 효율을 높이기 위하여 최적 흡광 파장이 다른 수 개 혹은 십여개의 pigments를 함께 보유하고 있다.

이들 해양식물의 carotenoids는 상당수가 여러 문이나 강에 걸쳐 분포하고 있으나 많은 경우에 어떤 특정한 종류의 식물에만 존재하므로 해당식물의 고유한 화학적특성으로 인식되어 그 결과 일찌기 부터 해양식물의 분류에 있어서 결정적인 인자의 역할을 하여 왔고 심지어는 해양식물의 진화의 연구에도 이용되고 있다. 해양식물의 pigments중 가장 잘 알려진 예를 들면 남조류의 특징적인 물질인 myxoxanthophyll, dinoflagellates에만 존재하는 peridinin과 dinoxanthin, diatom에서 주로 추출되는 diatoxanthin 및 yellow algae에서 다량으로 존재하는 fucoxanthin등이다(Fig. 2-5, Shin and Seo, 1991).

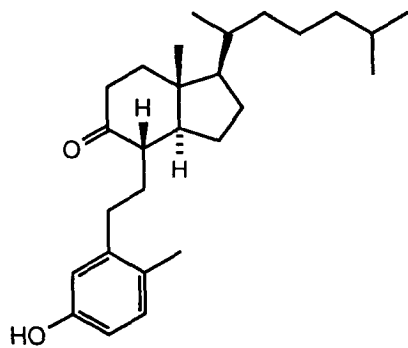
또 다른 *Muricella* sp.인 95J-18의 경우에도 methylene chloride층의 조추출물에 대한 ^1H NMR 분석결과 방향족 수소가 나타나는 위치에 흥미 있는 peak들이 나타났다. 따라서 methylene chloride 조추출물에 대한 silica vacuum flash chromatography를 실시하여 몇 개의 분획으로 나누고 ^1H NMR 측정에 의하여 다시 2차 대사물질을 추적(20-25% EtOAc/hexane 분획)한 후에 silica normal phase HPLC로 분리한 후에 다시 C_{18} reversed-phase HPLC를 이용하여 6종의 천연물을 순수하게 분리하였다(Fig. 2-6).

주대사물질 95J-18-A이 흰색 고체의 형태로 얻어 졌다. 이 물질의 분자식 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$ 는 ^{13}C NMR과 질량분석(LREIMS) 데이터에 의해서 결정되었다. ^{13}C NMR에서 나타난 28개의 peaks와 ^1H NMR에서 나타난 6개의 methyl peak는 이 물질이 steroid일 가능성을 강하게 제시해 주었다(Fig. 2-17, 2-18). ^{13}C NMR상의 δ 160 -110 영역에 6개의 downfield peaks가 나타났으며 ^1H NMR에서도 이에 대응하는 peaks가 δ 6.5 - 7.0 에서 발견되었다. 이 결과는 aromatic ring의 존재를 증명해 주었으며 계속해서 proton decoupling과 ^1H COSY 실험에 의하여 이 aromatic ring이 3-hydroxy-6-methyl-benzyl group이라는 것이 확인되었다. NMR을 비롯한 분광자료를 비교한 결과 이 물질은 본 연구진에서 이전에 동일한 속에 속하는 또 다른 생물에서 분리한 9,10-secosteroid 계열의 물질 calicoferol D와 동일한 물질로 결정되었다(Fig. 2-6, Seo *et al*, 1995).

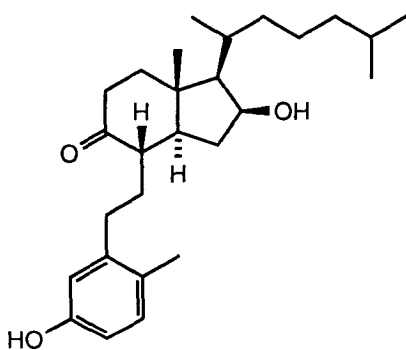
같은 계열에 속하는 물질인 95J-18-B가 분리되었다. 이 물질의 분자식 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$ 은 ^{13}C NMR 데이터와 고분능 질량분석(LREIMS) 데이터에 의해서 결정되었다. 95J-18-B의 NMR 분광 데이터는 calicoferol D(95J-18-A)와 대단히 유사하며 유일한 차이점은 C-22의 이중결합과



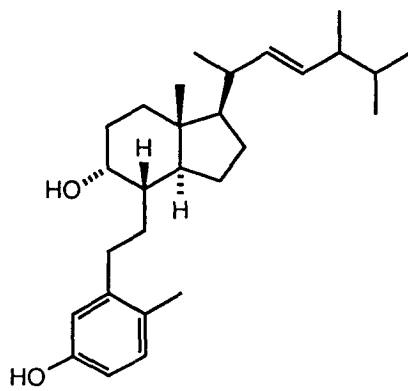
95J-18-A
(calicoferol D)



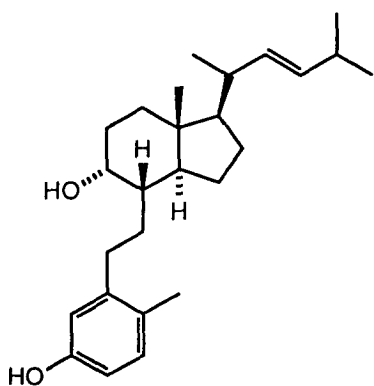
95J-18-B
(calicoferol E)



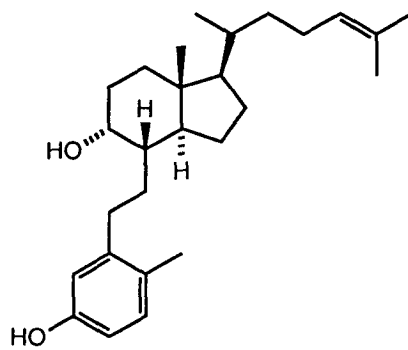
95J-18-C



95J-15-D



95J-18-E



95J-18-F

Fig. 2-6. 9,10-Secosteroids isolated from a gorgonian of the genus *Muricella*.

C-24 methyl signal이 사라졌다는 것이다(Fig. 2-19, 2-20). 분광 데이터 분석결과 이 물질 역시 이전에 분리되었던 calicoferol E(95J-18-B)로 확인되었다(Fig. 2-6, Seo, *et al*, 1995).

95-18-C는 oil의 형태로 얻어 졌으며 이 물질의 분자식 $C_{27}H_{42}O_3$ 은 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석(HREIMS) 데이터에 의해서 결정되었다. 이 물질의 분광 데이터는 95J-18-B와 대단히 유사하였으나 증대한 차이점이 발견되었다. 먼저 ^{13}C NMR의 δ 72.80 에서 하나의 methine peak가 나타났으며 이에 대응하는 변화가 1H NMR에서도 나타나 δ 4.45(1H, ddd, $J = 7.8, 6.8, 4.2$ Hz)에서 수소 하나에 해당하는 signal이 발견되었다(Fig. 2-21, 2-22). 이와 같은 분광 데이터 분석에 의하여 이 작용기는 secondary hydroxyl group으로 판단되며 이 작용기의 위치는 1H COSY 실험과 HMQC 실험에 의하여 cholesterol의 D ring에 위치한 C-16으로 확인되었다(Fig. 2-23, 2-24, Table 2-3). 그러므로 이 물질의 구조는 calicoferol E의 16-hydroxyl 유도체로 생각된다.

이 hydroxyl group에 의해서 새로 형성된 asymmetric carbon의 stereochemistry는 이 탄소와 1,3-diaxial relationship 관계에 있는 18-methyl기와 20-proton의 paramagnetic anisotropy에 의해서 결정되었다. 95J-18-C과 95J-18-B는 16-hydroxyl group에 의해서만 차이가 나며 18-methyl과 20-proton의 chemical shift를 비교해 볼 때 95J-18-C가 95J-18-B보다 각각 0.2와 0.5 ppm 더 down field에서 나타난다. 따라서 16-OH는 β orientation을 가지는 것으로 결론지을 수 있다. H-16의 coupling pattern(ddd, $J = 7.8, 6.8, 4.2$ Hz)도 이러한 해석을 지지하였다(Fig. 2-6).

유사한 secosteroid 95J-18-D가 무색의 oil 형태로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HREIMS) 데이터와 ^{13}C NMR 데이터에 의하여 $C_{28}H_{44}O_2$ 로 결정되었다. 이 물질의 분광자료는 calicoferol D(95J-28-A)와 대단히 유사하였으며 유일한 차이점은 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 C-9의 peak(δ 213.00)가 secondary hydroxyl peak(δ 67.25)로 변환된 점이였다(Fig. 2-25 ~ 2-28). 이에 상응하는 변화가 1H NMR 스펙트럼에서도 나타나 δ 4.04에 1개의 methine peak(1H, m)가 발견되었다(Fig. 2-25). 또 IR 스펙트럼에서도 1700 cm^{-1} 에 나타났던 carbonyl peak가 사라졌다. 그러므로 이 물질은 calicoferol D(95J-28-A)의 9-hydroxyl 유도체로 결정되었다(Fig. 2-6, Table 2-4).

또 다른 유사한 물질 95J-8-E가 점액성의 oil 형태로 얻어 졌으며 분자식은 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석(HREIMS) 데이터에 의하여 $C_{26}H_{40}O_2$ 로 결정되었다. 이 물질에 대한 NMR 스펙트럼 분석결과 또한 9,10-secosteroid의 유도체로서 95J-18-D와 매우 유사하였다(Fig. 2-29 ~ 2-32). 하지만 이러한 유사성에도 불구하고 상당한 차이점이 발견되었다. 먼저 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 모두 26개의 peak들이 발견되어 norcholestane 계열의 물질로 추정되었으며 95J-18-D와 비교해 볼 때 1개의 methyl peak와 1개의 methine carbon이 사라졌으며 C-24 ~ 26의 chemical shift값들이 상당한 변화를 보였다(Fig. 2-30). 상응하는 변화가 1H NMR 스펙트럼에서도 발견되어 δ 0.91 ppm(3H, d, $J = 6.8$ Hz)에 나타났던 peak가 없어 졌으며 side chain의 dimethyl peak와 인접하는 methine peak가 상당히 downfield(각각 0.12, 0.11, 0.37 ppm)로 shift되

Table 2-3. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-C.

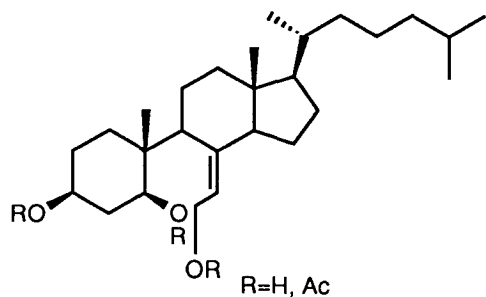
	H	C
1	6.99(1H, d, 8.1)	131.02 d
2	6.58(1H, dd, 8.1, 2.8)	112.50 d
3		153.53 s
4	6.66(1H,d,.8)	115.64 d
5		142.35 s
6	2.66(1H, ddd, 13.2, 13.2, 4.9), 2.43(1H, ddd, 13.2, 13.2, 5.7)	31.06 t
7	1.77(1H, m), 1.56(1H, m)	27.72 t
8	2.45(1H, m)	50.01 d
9		212.38 s
10		128.06 s
11	2.51(1H, ddd, 13.7, 13.7, 6.8), 2.32(1H, ddd, 13.7, 13.0, 5.6)	38.02 t
12	2.17(1H, ddd, 13.0, 6.8, 2.1), 1.53(1H, ddd, 13.7, 13.0, 5.6)	38.79 t
13		42.71 s
14	1.51(1H, m)	52.73 d
15	2.35(1H, brdd, 13.2, 7.8), 1.42(1H, ddd, 13.2, 13.2, 4.2)	37.03 t
16	4.45(1H, ddd, 7.8, 6.8, 4.2)	72.80 d
17	1.10(1H, dd, 10.8, 6.8)	60.51 d
18	1.18(3H, s)	12.71 q
19	2.25(3H, s)	17.96 q
20	1.93(1H, m)	29.61 d
21	1.00(3H, d, 6.8)	18.41 q
22	1.50(1H, m), 1.10(1H, m)	36.08 t
23	1.44(1H, m), 1.25(1H, m)	24.18 t
24	1.15(2H, m)	39.45 t
25	1.54(1H, m)	28.10 d
26	0.87(3H, d, 6.8)	22.59 q
27	0.88(3H, d, 6.8)	22.81 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

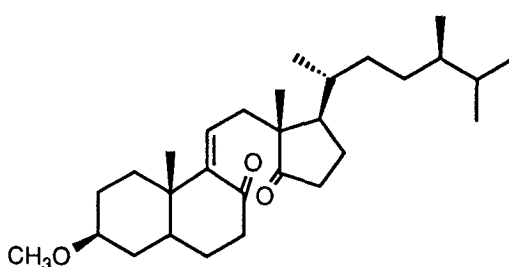
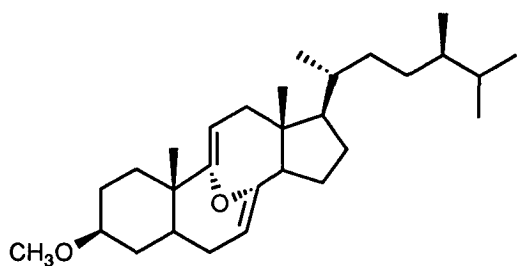
Table 2-4. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-D.

	H	C
1	6.98(1H, d, 8.1)	130.98 d
2	6.57(1H, dd, 8.1, 2.8)	112.37 d
3		153.55 s
4	6.65(1H,d, 2.8)	115.45 d
5		142.65 s
6	2.70(1H, ddd, 13.2, 11.2, 5.4), 2.42(1H, ddd, 12.7, 11.2, 5.4)	30.30 t
7	1.51(2H, m)	30.15 t
8	1.51(1H, m)	40.93 d
9	4.04(1H, m)	67.25 d
10		127.88 s
11	1.75(2H, m)	29.69 t
12	1.75(1H, m), 1.50(1H, m)	34.06 t
13		42.81 s
14	1.51(1H, m)	47.85 d
15	1.60(1H, m), 1.00(1H, m)	24.52 t
16	1.68(1H, m), 1.22(1H, m)	28.31 t
17	1.25(1H, m)	56.00 d
18	0.70(3H, s)	11.27 q
19	2.22(3H, s)	18.40 q
20	2.01(1H, m)	40.27 d
21	1.01(3H, d, 6.8)	21.04 q
22	5.14(1H, dd, 15.6, 6.6)	131.90 d
23	5.19(1H, dd, 15.6, 6.4)	135.84 d
24	1.82(1H, m)	43.04 d
25	1.46(1H, m)	33.23 d
26	0.83(3H, d, 8.0)	20.17 q
27	0.82(3H, d, 8.0)	19.69 q
28	0.91(3H, d, 6.8)	18.04 q

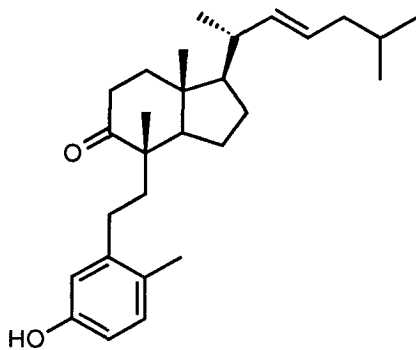
Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.



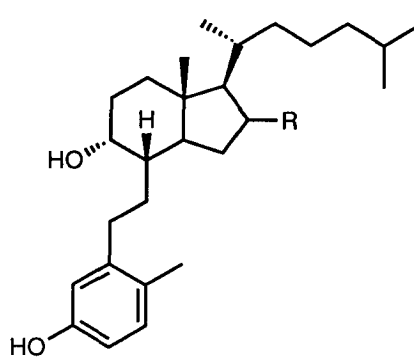
(sponge *Hippospongia communis*)



jereisterols A (left) and B (right)
(sponge *Jereicopsis graphidiophora*)

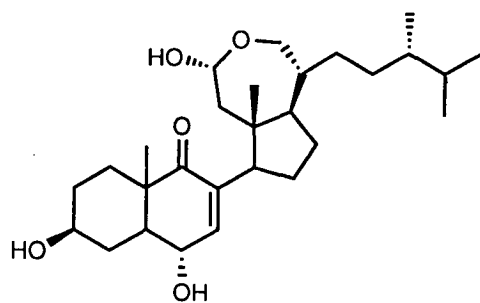


calicoferol A
(gorgonian *Calicogorgia* sp.)

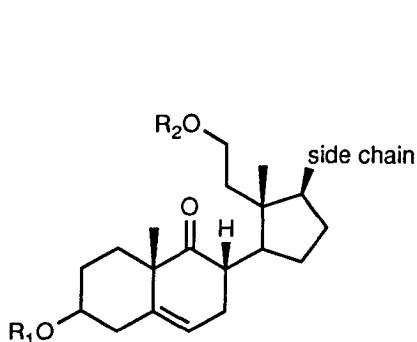


astrogorgiadiol (R=H)
and calicoferol B (R=OH)
(gorgonians *Astrogorgia* sp.
and *Calicogorgia* sp.)

Fig. 2-7. Secosteroids isolated from marine organisms.

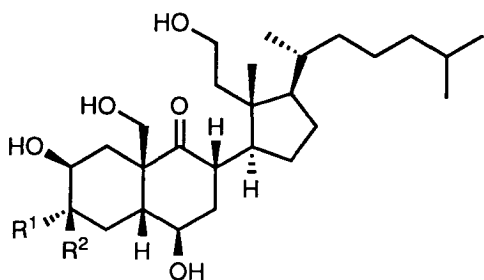
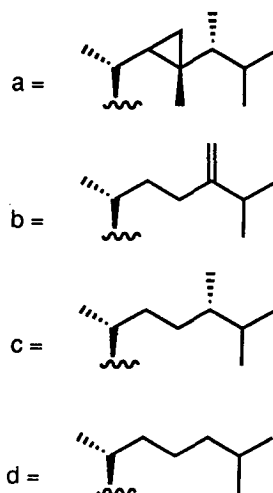


nicobarsterol
(soft coral *Sclerophyllum* sp.)

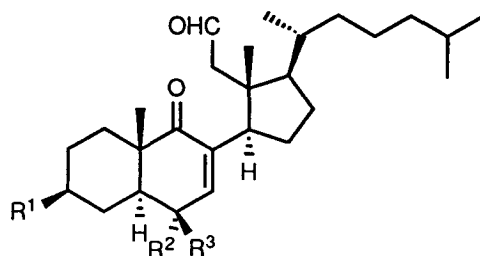


$R_1=R_2=H$, side chain=b, c, d
 $R_1=H$, $R_2=Ac$, side chain=b, c
 $R_1=R_2=Ac$, side chain=b
 (soft coral *Sinularia* sp.)

side chain

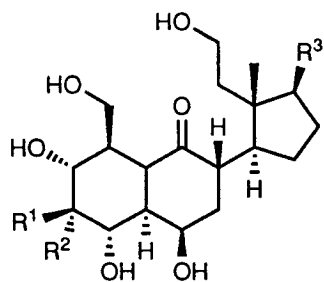


herbasterol ($R^1 = OH$, $R^2 = H$)
 (sponge *Dysidea herbacea*)
 stelletasterol ($R^1 = H$, $R^2 = OH$)
 (sponge *Stelletta* sp.)

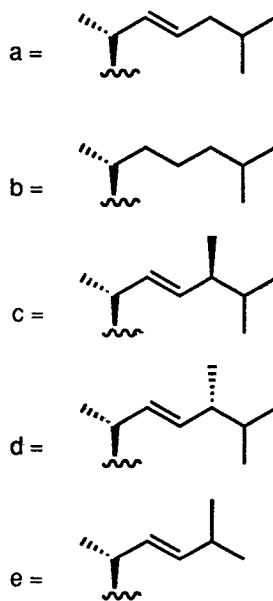


$R^1 = R^2 = OH$, $R^3 = H$ and
 $R^1 = OAc$, $R^2 = H$, $R^3 = OH$
 (sponge *Spongia officinalis*)

Fig. 2-7. Continued.



- R¹ = OH, R² = H, R³ = a
- R¹ = OH, R² = H, R³ = b
- R¹ = OH, R² = H, R³ = c
- R¹ = OH, R² = H, R³ = d
- R¹ = OH, R² = H, R³ = e
- R¹ = H, R² = OH, R³ = a
- R¹ = H, R² = OH, R³ = b
- R¹ = H, R² = OH, R³ = c
- R¹ = H, R² = OH, R³ = d
- R¹ = H, R² = OH, R³ = e



(sponge *Euryspongia* sp.)

Fig. 2-7. Continued.

Table 2-5. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-E.

	H	C
1	6.98(1H, d, 8.3)	130.97 d
2	6.57(1H, dd, 8.3, 2.5)	112.35 d
3		153.51 s
4	6.65(1H,d, 2.5)	115.43 d
5		142.66 s
6	2.71(1H, ddd, 13.2, 11.5, 5.1), 2.42(1H, ddd, 13.2, 10.7, 5.4)	30.88 t
7	1.52(2H, m)	30.30 t
8	1.53(1H, m)	40.92 d
9	4.04(1H, m)	67.19 d
10		127.90 s
11	1.75(2H, m)	30.17 t
12	1.71(1H, m), 1.51(1H, m)	34.07 t
13		42.81 s
14	1.52(1H, m)	47.83 d
15	1.56(1H, m), 1.08(1H, m)	24.41 t
16	1.65(1H, m), 1.23(1H, m)	27.93 t
17	1.20(1H, m)	56.03 d
18	0.70(3H, s)	11.29 q
19	2.22(3H, s)	18.40 q
20	2.00(1H, m)	39.89 d
21	1.00(3H, d, 6.8)	20.84 q
22	5.16(1H, dd, 15.6, 6.6)	133.42 d
23	5.27(1H, dd, 15.6, 6.4)	134.89 d
24	2.19(1H, m)	30.95 d
25	0.95(3H, s)	22.81 q
26	0.93(3H, s)	22.81 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY and HMQC experiments.

Table 2-6. Proton and carbon NMR assignments for 95J-18-F.

	H	C
1	6.98(1H, d, 7.8)	130.97 d
2	6.57(1H, dd, 7.8, 2.5)	112.35 d
3		153.52 s
4	6.65(1H, d, 2.5)	115.43 d
5		142.67 s
6	2.71(1H, ddd, 13.2, 11.2, 5.4)	30.89 t
	2.42(1H, ddd, 13.2, 11.5, 5.1)	
7	1.52(2H, m)	30.31 t
8	1.50(1H, m)	40.91 d
9	4.04(1H, m)	67.18 d
10		127.90 s
11	1.75(2H, m)	30.18 t
12	1.77(1H, m), 1.49(1H, m)	34.14 t
13		42.93 s
14	1.52(1H, m)	47.76 d
15	1.58(1H, m), 1.06(1H, m)	24.48 t
16	1.83(1H, m), 1.23(1H, m)	27.74 t
17	1.21(1H, m)	56.09 d
18	0.69(3H, s)	11.06 q
19	2.22(3H, s)	18.40 q
20	1.40(1H, m)	35.59 d
21	0.94(3H, d, 6.8)	18.63 q
22	1.40(1H, m), 1.06(1H, m)	36.07 t
23	1.57(1H, m), 1.08(1H, m)	24.67 t
24	5.09(1H, tt, 6.8, 1.5)	125.10 d
25		130.97 s
26	1.68(3H, s)	25.76 q
27	1.60(3H, s)	17.68 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY and HMQC experiments.

었다(Fig. 2-29). ^1H COSY와 HMQC 실험에 의하여 δ 5.19(1H, dd, $J = 15.6$ and 6.4 Hz)에서 발견되는 이중결합의 peak가 methine proton과 coupling을 하며 이 methine proton은 side chain의 dimethyl peak들과 correlation함이 확인되었다(Fig. 2-31, 2-32). 그러므로 이 물질의 구조는 95J-18-D에서 C-24와 C-28가 없어진 norcholestane계열의 9,10-secosteroid로 결정되었다(Fig. 2-6, Table 2-5).

마지막으로 95J-18-F가 viscous oil의 형태로 분리되었으며 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석(HREIMS) 데이터에 의하여 분자식이 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$ 로 결정되었다. 이 물질의 분광 데이터 역시 다른 9,10-secosteroid와 대단히 유사한 형태를 보여 같은 계열의 물질로 추정되었다. ^{13}C NMR에서 1개의 oxygenated methine carbon(δ 67.18)과 8개의 이중결합의 peak들을 포함해서 모두 27개의 signal들이 발견되었다(Fig. 2-34). 알려진 9,10-secosteroid인 astrogorgiadiol과 ^{13}C NMR 분광 데이터를 비교했을 때 C-23, C-24, C-25, C-26, C-27을 제외하고는 chemical shift가 거의 일치하였기 때문에 이 주변의 탄소들에 변화가 생긴 것으로 판단되었다(Fusetani, *et al*, 1985). 또 ^1H NMR에서 δ 5.09(1H, tt, $J = 6.8$ and 1.5 Hz)에 1개의 새로운 수소 peak가 발견되었다(Fig. 2-33). ^1H COSY와 HMQC 실험에서 astrogorgiadiol에서 나타났던 C-25 methine proton이 사라져 C-26, C-27 methyl proton들과 coupling하는 수소들이 전혀 발견되지 않았다(Fig. 2-35, 2-36). 그러므로 이 물질의 구조는 astrogorgiadiol의 H-24와 H-25들이 제거되어 하나의 이중결합이 형성된 24,25-didehydrogenated astrogorgiadiol로 결정되었다(Fig. 2-6, Table 2-6).

Vitamin D를 포함하는 secosteroids는 육상생물에서 비교적 드물지 않게 발견된다. 그러나 이들은 해양생물에서는 상당히 발견되는 예가 상당히 드물어 지금까지 단지 다음과 같은 30여 개의 예가 알려져 있을 뿐이다(Fig. 2-7). Sponge *Hippospongia communis*로부터 5,6-secosteroid가 분리되었다. 이 물질은 해양에서 발견된 최초의 B ring이 끊어진 secosteroid이다(Madaio *et al*, 1988; 1990). Sponge *Jereicopsis graphidiophora*로부터 8,9 및 8,14-secosteroids인 jereisterols A와 B가 분리되었다(D'Auria *et al*, 1991). Gorgonian *Astrogorgia* sp.와 *Calicorgorgia* sp.로부터 9,10-secosterols가 분리되었으며(Fusetani *et al*, 1989; Ochi *et al*, 1991) soft coral *Sclerophyllum* sp., *Sinularia* sp., *Gersemia fruticosa*와 gorgonian *Pseudopterogorgia americana* 그리고 sponge *Dysidea herbacea*, *Pleraplysilla* sp., *Spongia officinalis*, *Euryspongia* sp. 및 *Stelletta* sp.로부터 9,11-secosteroids가 분리되었다(Enwall *et al*, 1972; Kazlauskas *et al*, 1982; Bonini & Cooper, 1983; Capon & Faulkner, 1985; Kobayashi *et al*, 1991; Migliuolo *et al*, 1992; Pika and Andersen, 1993; Koljak *et al*, 1993; Adinolfi *et al*, 1994; Dopeso *et al*, 1994; Li *et al*, 1994; He *et al*, 1995).

2. 3. *Euplexaura anastomosans*의 대사 물질

본 연구에서 사용된 시료 gorgonian는 91년 거문도 근해인 서도, 대삼부도, 소삼부도에서 채

집된 *Euplexaura anastomosans*(시료 번호 91K-1)이다. 군체의 특징은 오렌지 색깔을 띠고 관목 형태로 되어 있으며 가지(branch)의 수가 적었다. 군체의 크기는 일반적으로 30 - 50 cm로서 큰 것은 대략 60 ~ 70 cm 정도 되었다.

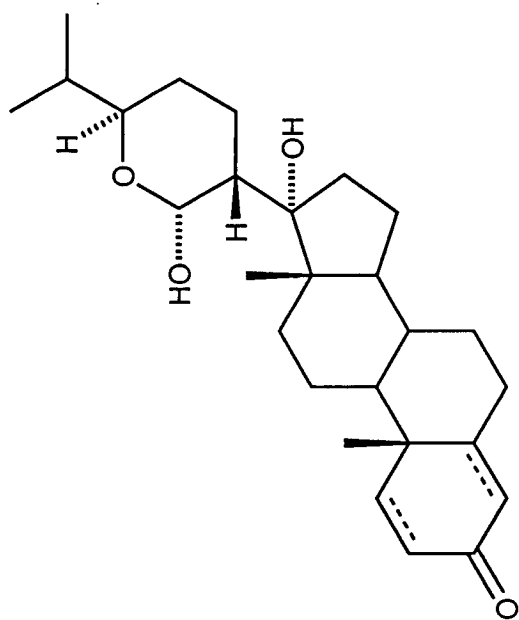
약 5 kg 이상으로 추정되는 이 생물을 그 동안 냉동보관하여 왔으며 본 연구를 위해 옹달에서 1일 정도 말린 후 methylene chloride와 methanol로 각각 두차례에 걸쳐 유기물질을 추출하였다. 이때 methylene chloride에서 추출된 전체적인 양은 30 g 이었으며 methanol에서는 10g 정도의 유기 조추출물이 얻어 졌다. 각각의 유기 조추출물에 대한 ^1H NMR 데이터 분석과 간단한 brine shrimp lethality 측정 결과methanol에서 추출된 유기물질보다 methylene chloride에서 추출된 유기 조추출물에 흥미로운 물질이 존재할 가능성이 높다는 것을 예상할 수 있었다.

이와 같이 일차적으로 선정된 methylene chloride 용매에서 추출된 유기조추출물을 silica vacuum flash chromatography를 이용하여 hexane에 EtOAc를 5% 간격으로 증가하면서 만든 혼합용매로 서로 다른 20개의 분획으로 나누었다. 이렇게 하여 나누어진 각 분획에 대하여 ^1H NMR을 측정한 결과 혼합 용매상으로 볼 때 대체로 비극성과 극성의 중간층인 30%-, 35%-, 40%-, 45%-EtOAc/hexane 분획에서 downfield영역에 특정한 선들과 upfield에 뚜렷한 methyl선들이 나타나 일차적으로 흥미를 가질수 있는 화합물들이 존재함을 알 수 있었다. 이들 spectrum의 특징을 보면 downfield 영역에 수소선이 중복되어 있지 않은 독립된 선들이 있었고 또한 3~5 ppm영역에서도 분산된 다양한 선들이 나타났다. 그러나 이 분획들을 제외한 다른 분획의 spectrum은 흔히 볼수 있는 지방산 계열의 물질이라 추정되는 혼합물이 주류를 이루었으며 또한 upfield에서 심한 중복된 선들이 나타나 일차적으로 큰 관심을 주지 못하였다.

30 - 45% EtOAc/hexane 분획들에 대해서 각각 silica와 C_{18} reversed-phase HPLC를 반복한 결과 모두 4개의 순수한 2차 대사물질들을 분리할 수 있었으며 이들은 ^1H 과 ^{13}C NMR spectrum 데이터 분석에 의해서 모두 side chain에 tetrahydropyran ring을 갖는 cholestane계열의 특이한 steroidal hemiacetal임을 알 수 있었다(Fig. 2-8).

주대사물질 anastomosacetal A(91K-1-A)가 흰색고체로 얻어 졌으며 고분별능 질량분석(HRFABMS) 데이터와 ^{13}C NMR 분석 결과로부터 $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_4$ 의 분자식을 갖는 물질임을 알 수 있었다(Fig. 2-38). ^{13}C NMR과 DEPT 실험으로부터 이 물질의 탄소는 methyl기가 4개, methylene기가 8개, methine기가 10개로 구성되어져 있었으며 이 중 탄소 spectrum의 δ 70 - 100 영역에 나타난 3개의 선(δ 93.14s, 84.03s, 73.51d)으로 부터 oxygenated carbon이 존재한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 2-39). 대응하는 변화가 ^1H NMR에서도 발견되어 δ 5.50(1H, br s), 3.60(1H, ddd, $J = 11.7, 6.4, 2.0$ Hz)에서 수소 신호들이 나타났다. D_2O exchange 실험에서 hydroxyl group으로 여겨지는 δ 3.48(1H, s)과 2.93(1H, br s)에 존재하는 peak들이 사라지고 δ 5.50에 나타났던 broad singlet가 doublet($J = 2.3$ Hz)로 바뀌어져 이 해석의 타당함을 지지하였다(Fig. 2-37).

이 물질의 전체적인 구조결정과 탄소 및 수소에 대한 정확한 assign은 ^1H COSY, HMQC 그리고 HMBC 실험에 의하여 이루어 졌으며 steroid의 A, B, C ring과 side chain에 해당되는 모든 peak들을 분명하게 결정할 수 있었다(Fig. 2-40 ~ 2-42, Table 2-7).



Anastomosacetal A (91K-1-A)

B (91K-1-B: 4,5-dihydro)

C (91K-1-C: 1,2-dihydro)

D (91K-1-D: 1,2,4,5-tetrahydro)

Fig. 2-8. Structures of anastomosacetals A-D.

Table 2-7. Proton and carbon NMR assignments for anastomosacetal A(91K-1-A).

	H	C
1	7.05 (1H, d, 10.1)	155.81 d
2	6.22 (1H, dd, 10.0, 2.0)	127.49 d
3		186.41 s
4	6.07 (1H, brs)	123.83 d
5		169.27 s
6	2.46 (1H, ddd, 13.4 13.2 4.2) 2.36 (1H, ddd, 13.4 3.0 3.0)	32.93 t
7	1.95 (1H, m), 1.10 (1H, m)	33.61 t
8	1.64 (1H, m)	35.70 d
9	1.08 (1H, ddd, 11.7, 11.7, 3.9)	51.81 d
10		43.55 s
11	1.71 (2H, m)	22.72 t
12	1.74 (1H, m), 1.54 (1H, m)	32.24 t
13		47.58 s
14	1.76 (1H, m)	49.38 d
15	1.62 (1H, m), 1.17 (1H, m)	23.48 t
16	1.67 (2H, m)	36.80 t
17		84.03 s
18	0.87 (3H, s)	14.76 q
19	1.24 (3H, s)	18.74 q
20	1.89 (1H, ddd, 12.7, 3.4, 2.9)	44.53 d
21	5.50 (1H, br s)	93.14 d
22	2.02 (1H, dddd, 13.2, 13.2, 12.7 3.5), 1.62 (1H, m)	19.47 t
23	1.74 (1H, m), 1.33 (1H, dddd, 13.2, 13.2, 11.7 3.9)	28.17 t
24	3.60 (1H, ddd, 11.7, 6.4, 2.0)	73.51 d
25	1.60 (1H, m)	32.66 d
26	0.91 (3H, d, 6.8)	18.65 q
27	0.88 (3H, d, 6.8)	18.36 q
17-OH	3.48 (1H, s)	
21-OH	2.93 (1H, s)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

먼저 $\alpha, \beta, \alpha', \beta'$ -unsaturated carbonyl group의 존재가 ^{13}C NMR에서 나타난 δ 186.30의 carbon과 IR spectrum상의 1660 cm^{-1} 에 나타난 강한 흡수선에 의해서 분명하게 확인되었으며 UV spectrum의 240 nm 에서 발견된 최대흡수 peak도 이 사실을 지지하였다. NMR spectrum을 분석한 결과 이것은 전형적인 1,4-cyclohexadien-3-one moiety로서 steroid에서는 A ring에 해당함을 알 수 있다. HMBC 실험에서 δ 0.87에 나타난 singlet methyl proton(H-19)은 두 개의 quaternary carbon들(δ 169.27, 43.55) 및 두 개의 methine carbon들(δ 155.81, 51.81)과 long-range coupling을 하고 있었다(Fig. 2-42). 그 중 quaternary 와 methine carbon들 중 각각 하나가 δ 150 이하의 downfield에 위치하고 있었으므로 이들은 이중 결합에 해당하는 것을 알 수 있었다. 이들 중 δ 155.81에 나타난 methine은 steroid A ring의 1,4-cyclohexadien-3-one moiety로부터 유추해 볼 때 C-1에 해당되며 δ 169.27에 나타난 quaternary 탄소는 C-5에 해당하는 것이 분명하였다. 따라서 δ 186.30의 carbonyl carbon은 C-3로 지정되었다.

A ring과 마찬가지로 B, C ring에 위치한 탄소 및 수소들도 HMQC, ^1H COSY로부터 대부분 쉽게 지정할 수 있었으며 나머지 불 명확한 몇 개의 carbon들은 HMBC 실험에 의하여 정확하게 지정할 수 있었다(Fig. 2-40 ~2-42). 문헌조사에 의하면 anastomosacetal A의 A B C ring의 구조는 산호 *Minabea*종으로부터 분리된 withanolides 계열의 steroids인 minabeolides의 A, B, C ring의 구조와 같았으며 NMR을 비롯한 분광자료도 거의 동일하였다(Table 2-7, Ksebati & Schmitz, 1988).

D ring과 side chain에 대한 구조는 일반적인 cholestane의 side chain과는 다르다는 것을 NMR spectrum으로부터 알 수 있었다. 먼저 methyl수가 cholestane보다 한 개 적을 뿐 아니라, 이 물질의 분자식과 NMR data로부터 예측되는 산소 수가 C-3에 있는 carbonyl group의 산소를 제외하면 세 개의 산소가 D ring과 side chain에 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다. HMBC 실험에서 나타난 correlation을 분석해 보면 먼저 δ 1.24에 위치한 C-18 singlet methyl proton은 두 개의 quaternary, 하나의 methine 그리고 하나의 methylene 탄소들과 long-range coupling을 하고 있는데 그 중 δ 32.24에 존재하는 methylene 탄소는 C-12에 해당됨을 쉽게 알 수 있었고 두 quaternary 탄소중 하나가 산소와 결합하는 탄소의 영역, 즉 δ 84.03에 위치하는 것으로 볼 때, 남은 δ 47.58 에 있는 quaternary 탄소는 C-13임을 알 수 있다(Fig. 2-42). 그러나 산소와 결합하는 탄소가 C-14인지 혹은 C-17인지는 분명하지 않았다. 이 문제점은 ^1H COSY 실험에서 H-20을 한 쪽 terminal로 하는 spin system의 추적에 의하여 산소가 C-17에 결합된 것으로 결정되었다(Fig. 2-40).

Side chain의 구조를 살펴보면 ^1H NMR spectrum에서 H-26과 H-27의 methyl proton들이 뚜렷하게 doublet로 분리되어 나타나고 있는데 이는 ^1H COSY 실험에서 H-25 methine과의 long-range coupling으로 인한 것이었으며 H-25는 δ 3.60에 나타난 H-24(1H, ddd, $J = 11.7, 6.4, 2.0\text{ Hz}$)와 direct coupling을 하고 있었다. 이 수소가 붙어 있는 C-24의 chemical shift가 δ 73.51인 것으로 볼 때 oxymethine임을 알 수 있었다. 한편 ^1H COSY 실험에서 δ 2.93에 나타난 hydroxyl proton이 δ 5.50에 있는 H-21과 강한 coupling을 하고 있었으며 D_2O exchange 실험에

서 H-21이 broad singlet 으로부터 doublet으로 변하는 사실로서 C-21에 hydroxyl group이 접합되어 있음이 분명하였다. HMQC 자료에 의하여 C-21의 chemical shift가 δ 93.14으로 지정된 사실은 C-21의 hydroxyl group이 단순한 alcoholic hydroxyl이 아니라 hemiacetal group으로 판단되었다(Fig. 2-41).

HMBC 실험에서 δ 2.93의 hydroxyl proton은 앞에서 결정된 C-24와 long-range coupling을 하는 것이 발견되었다(Fig. 2-42). 이들 두 carbons에 접합된 protons간의 correlation이 전혀 없이 H-C correlation을 이룬다는 사실은 C-21의 탄소가 C-24의 탄소와 ether 결합으로 연결된 tetrahydropyran ring을 형성하고 있는 것을 의미하였다. 이 해석은 C-21에 있는 hydroxyl 수소가 δ 44.52에 있는 C-20 methine과 long-range coupling을 하는 점과 일반적인 cholestane 계열의 steroid 보다 C-21에 위치한 methyl기 한 개가 부족하다는 사실에 의해서도 입증되었다. δ 3.48에 나타난 나머지 한 개의 tertiary hydroxyl기의 위치는 COSY 및 proton decoupling 실험에서 H-20이 H-21과 H-22의 수소와 coupling을 이루는 것($J_{20,21} = 2.9\text{Hz}$, $J_{20,22} = 12.7$ 과 3.4 Hz) 으로부터 C-17에 붙어 있다는 것을 알 수 있다. 이와 같이 하여 이 물질의 A, B, C, D ring과 그 side chain의 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 2-8, Table 2-7).

물질 91K-1-A는 C-17, C-20, C-21 그리고 C-24 위치에 비대칭 탄소 중심을 갖고 있다. 이들 탄소 중심의 stereochemistry는 proton coupling constants 측정과 NOESY 실험에 의하여 결정되었다(Fig. 2-43). NOESY spectrum상에서 H-20과 H-21의 수소들이 H-18 methyl 수소와 강한 correlation을 보여주었다. 그리고 앞서 설명한 H-20과 H-21사이에서 일어나는 axial-equatorial coupling constant($J = 2.9\text{ Hz}$) 그리고 H-20과 H-22사이 axial-axial($J = 12.7\text{ Hz}$)과 axial-equatorial coupling constants($J = 3.4\text{ Hz}$)로부터 H-20 수소는 axial로, H-21의 수소는 equatorial로 배열되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 분자의 공간적인 배열은 NOESY에서 H-21과 δ 1.54에 있는 H-21 β 와 H-20사이에서 나타나는 correlation을 설명해 준다. 이러한 배열을 갖기 위해서는 자연히 OH-17는 D ring에 대해서 α 배열을 가져야 한다. 같은 방법으로 H-24는 H-23와의 axial-axial coupling constant($J = 11.7\text{ Hz}$)와 axial-equatorial coupling constant($J = 2.0\text{ Hz}$)로부터 axial로 존재하는 것을 알 수 있었으며 H-23 β 와 H-26, H-27과의 강한 NOESY correlation으로 이러한 해석을 잘 뒷받침해 주고 있다(Fig. 2-43). 이리하여 anastomosacetal A에 존재하는 비대칭 탄소의 stereochemistry는 17α , $20R$, $21R$, $24R$ 로 명확히 결정되었다(Fig. 2-8).

밀접하게 구조적으로 관련된 부대상물질 anastomosacetal B(91K-1-B)가 흰색고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고분능 질량분석(HRFABMS) 데이터와 ^{13}C NMR 분석 결과에 의하여 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$ 로 결정되었다. 이 물질의 구조는 anastomosacetal A와 매우 유사하다는 사실을 spectral data로부터 알 수 있었다(Table 2-8). 단지 A ring의 구조가 약간 차이가 난다는 사실이 ^1H 및 ^{13}C NMR spectra로부터 쉽게 확인되었다(Fig. 2-44 ~ 2-46). 먼저 눈에 띄게 달라진 점은 ^{13}C NMR spectrum에서 C-4와 C-5에 해당하는 olefinic carbon signals이 사라진 대신에 upfield에 새로이 두 개의 carbon peaks가 나타났다. 상응하는 변화가 ^1H NMR에서도 관찰되어

Table 2-8. Proton and carbon NMR assignments for anastomosacetal B(91K-1-B).

	H	C
1	7.13 (1H, d, 10.3)	158.44 d
2	5.85 (1H, d, 10.3)	127.41 d
3		200.25 s
4	2.36 (1H, dd, 18.1 14.2) 2.22 (1H, br d, 18.1 3.9)	40.97 t
5	1.92 (1H, m)	44.22 d
6	1.46 - 1.41 (2H, m)	27.63 t
7	1.69 (1H, m), 1.02 (1H, m)	31.22 t
8	1.50 (1H, m)	35.80 d
9	1.02 (1H, m)	49.43 d
10		38.91 s
11	1.82 (1H, m), 1.46 - 1.41 (1H, m)	21.15 t
12	1.75 (1H, m), 1.57 (1H, m)	32.46 t
13		47.64 s
14	1.78 (1H, m)	50.21 d
15	1.65 (1H, m), 1.10 (1H, m)	23.19 t
16	1.69 (2H, m)	36.93 t
17		84.14 s
18	0.84 (3H, s)	14.90 q
19	1.00 (3H, s)	12.98 q
20	1.88 (1H, m)	44.61 d
21	5.51 (1H, br s)	93.22 d
22	2.01 (1H, dddd, 13.2, 13.2 12.7 3.9) 1.61 (1H, m)	19.48 t
23	1.72 (1H, m), 1.34 (1H, dddd, 13.2 13.2 11.7, 3.9)	28.18 t
24	3.61 (1H, ddd, 11.7 6.4 2.0)	73.51 d
25	1.61 (1H, m)	32.65 d
26	0.93 (3H, d, 6.8)	18.65 q
27	0.88 (3H, d, 6.8)	18.36 q
17-OH	3.47 (1H, s)	
21-OH	2.92 (1H, s)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

H-4의 signal이 사라졌음을 알 수 있었다. 뿐만아니라 HMQC 실험에 의해서 이들 두 탄소에 접합된 수소들을 확인 할 수 있었으며 ^1H COSY에서도 이들 수소 주변의 correlation들이 명확히 발견되었다(Fig. 2-47, 2-48). 그러므로 물질 91K-1-B는 anastomosacetal A에 존재하였던 C-4 이중결합이 hydrogenation 되었음을 보여주었다. 그리고 이 사실은 IR과 UV 스펙트럼(1680cm^{-1} ; 230nm)에서도 입증되었다. 이와같이 anastomosacetal B는 anastomosacetal A의 4,5-dihydro 유도체로 결정되었다(Fig. 2-8).

또 다른 부대사물질 anastomosacetal C(91K-1-C)가 역시 흰색 고체로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HRFABMS) 데이터와 ^{13}C NMR 분석결과로부터 anastomosacetal B와 같은 것으로 결정되었다. 그러나 이 물질은 산성조건하에서 불안정하여 쉽게 분해되었기 때문에 이 물질에 대한 NMR 실험을 하기 위해 용매를 C_6D_6 로 바꾸어 모든 자료를 얻었다(Table 2-9). 비록 다른 용매가 사용되어졌지만 anastomosacetals A와 B의 data와 아주 유사한 NMR spectra를 얻을 수 있었다(Fig. 2-49 ~ 2-52). 역시 이 물질에 대해서도 구조 해석 결과 A ring에서의 작은 차이를 제외하고는 anastomosacetal A와 비슷한 구조를 갖고 있음을 알 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum에서 보면 C-1과 C-2의 chemical shift 값이 upfield로 이동하였고 ^1H COSY, HMQC 실험을 종합해 볼 때 C-1에 있는 이중결합이 hydrogenation되었음을 알 수 있었다. 따라서 anastomosacetal C의 구조는 anastomosacetal A의 1,2-dihydro 유도체로 결정되었다(Fig. 2-8).

마지막으로 부대사물질 anastomosacetal D(91K-1-D)가 흰색고체로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HRFABMS) 데이터와 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터에 의해서 $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$ 으로 결정되었다. 이 구조는 대사물질 anastomosacetals A, B, C와 같은 골격을 갖는 유도체임을 같은 NMR 방법으로 알 수 있었으며 차이점은 C-1과 C-4위치에 존재하던 두 개의 이중결합 모두가 hydrogenation되어 있다는 점이다(Fig. 2-53 ~ 2-57, Table 2-10). IR spectrum에서 1710cm^{-1} 에 나타난 강한 흡광 밴드와 UV 스펙트럼상에서 별다른 신호를 주지 않는다는 점이 이 사실을 강하게 뒷받침 해 주고 있다. 따라서 anastomosacetal D는 anastomosacetal A의 1,2,4,5-tetrahydro 유도체이다(Fig. 2-8).

문헌조사에 의하면 지금까지 해양생물로부터 side chain이 변화되어 형성된 hemiacetal 혹은 hemiketal과 같은 작용기를 갖는 polyoxygenated steroid들이 적지않게 발견되었다(Faulkner, 1995; D'Auria *et al*, 1993; Ciminiello *et al*, 1990; Kobayashi *et al*, 1991; Burgoyne *et al*, 1992; Roussis *et al*, 1993). 그러나 anastomosacetals는 C-21 methyl group이 산화되어 hemiacetal 작용기를 갖고 있는 steroid이다. 조사한 바에 의하면 이러한 골격의 hemiacetal들이 지금까지 해양생물에서 발견된 적이 없으며 anastomosacetals은 이런 형태의 물질로서는 해양에서 나온 첫 번째 물질로 결론지워 졌다(Seo *et al*, 1996).

*E. anastomosans*의 조추출물은 P388 cell-line(LC_{50} $73.3\ \mu\text{g}/\text{ml}$)와 brine-shrimp larvae(LC_{50} 303ppm)에 대해서 moderate cytotoxicity를 보여주었다. 그러나 분리 정제된 물질에 대해서 같은 test를 한 결과 anastomosacetals은 cancer cell-line 뿐만아니라 brine-shrimp larvae에 대해서도

Table 2-9. Proton and carbon NMR assignments for anastomosacetal C(91K-1-C).

	H	C
1	1.57 (1H, m), 1.34 (1H, m)	35.89 t
2	2.31 (1H, br ddd, 16.9 3.9 3.4) 2.20 (1H, ddd, 16.6 14.7 4.9)	34.33 t
3		196.92 s
4	5.83 (1H, br s)	124.18 d
5		168.54 d
6	1.93 (1H, dddd, 14.2 13.8 4.4 1.9), 1.84 (1H, m)	32.75 t
7	1.48 (1H, m), 0.78 (1H, m)	32.16 t
8	1.16 (1H, m)	35.83 d
9	0.66 (1H, ddd, 11.7 11.2 3.4)	53.34 d
10		38.34 s
11	1.29 (1H, m) 1.12 (1H, m)	21.08 t
12	1.22 (1H, m)	32.48 t
13		47.40 s
14	1.79 (1H, m)	49.93 d
15	1.60 (1H, m), 0.89 (1H, m)	23.66 t
16	1.54 (1H, m)	37.14 t
17		83.79 s
18	0.57 (3H, s)	14.70 q
19	0.77 (3H, s)	17.13 q
20	1.75 (1H, m)	45.04 d
21	5.25 (1H, br s)	93.17 d
22	1.54 (1H, m)	19.98 t
23	1.57 (1H, m), 1.18 (1H, m)	28.76 t
24	3.57 (1H, br dd, 11.7 6.2)	73.12 d
25	1.65 (1H, m)	33.16 d
26	1.04 (3H, d, 6.8)	18.80 q
27	0.93 (3H, d, 6.8)	18.72 q
17-OH	3.44 (1H, s)	
21-OH	3.00 (1H, br s)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in C₆D₆ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-10. Proton and carbon NMR assignments for anastomosacetal D(91K-1-D).

	H	C
1	2.01 (1H, m), 1.37 - 1.26 (1H, m)	38.53 t
2	2.37 (1H, ddd, 15.6 13.7 6.3) 2.29 (1H, dddd, 15.6 4.9 2.4 2.4)	38.20 t
3		212.08 s
4	2.26 (1H, dd, 14.7 14.2) 2.07 (1H, ddd, 14.7 3.9 2.0)	44.68 t
5	1.53 (1H, m)	46.60 s
6	1.37 - 1.26 (2H, m)	28.94 t
7	1.71 - 1.65 (1H, m) 0.96 (1H, dddd, 12.7 12.2 12.2 4.9)	31.64 t
8	1.43 (1H, dddd, 11.7 10.7 10.7 3.9)	35.55 d
9	0.78 (1H, ddd, 12.2 10.7 3.4)	53.28 d
10		35.60 s
11	1.62 (1H, m), 1.38 (1H, m)	21.33 t
12	1.58 (2H, m)	32.52 t
13		47.53 s
14	1.76 (1H, m)	50.17 d
15	1.71 - 1.65 (1H, m), 1.09 (1H, m)	23.31 t
16	1.71 - 1.65 (2H, m)	36.93 t
17		84.28 s
18	0.81 (3H, s)	14.80 q
19	1.01 (3H, s)	11.47 q
20	1.88 (1H, ddd, 12.7, 2.4, 2.4)	44.61 s
21	5.51 (1H, br s)	93.21 d
22	2.01 (1H, m), 1.60 (1H, m)	19.49 t
23	1.72 (1H, m), 1.37 - 1.26 (1H, m)	28.19 t
24	3.60 (1H, ddd, 11.7 6.4 2.0)	73.48 d
25	1.60 (1H, m)	32.65 d
26	0.88 (3H, d, 6.8)	18.66 q
27	0.91 (3H, d, 6.8)	18.35 q
17-OH	3.45 (1H, s)	
21-OH	3.03 (1H, br s)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shift are reported in δ values. *J* values are reported in Hz. Assignments were aided by COSY, HMQC and HMBC experiments.

아무런 활성을 보여 주지 않았다. 현재 추출물에서 보여주었던 독성을 갖는 물질에 대해서 현재 추적중에 있으며 연구 결과는 차기년도에 보고될 예정이다.

2. 4. 실험방법

2. 4. 1. 기기 및 시약

NMR 측정은 Varian Unity 500기기를 사용하여 수소 스펙트럼은 주파수 500 MHz에서 탄소는 125 MHz에서 각각 얻어졌다. 2차원 실험을 위해 필요한 변수는 표준시료를 사용하여 얻어진 기준 값을 이용하였으며 data processing은 Varian사에서 제공되는 VNMR software를 사용하였다. 실험에 사용된 주요 NMR 용매는 CDCl_3 이며 모든 측정은 24 °C에서 이루어졌다. HPLC는 Spectra-physics의 Isochrom isocratic pump를 중심으로 Rheodyne 7825 injector, Shodex RI detector 그리고 Linear 2-pen recorder로 구성하여 본 실험실에서 조립되어졌고 물질 분리에 사용된 HPLC column은 YMC silica semi-prep column(1 × 25 cm), YMC C_{18} reversed -phase semi-prep column(1 × 25 cm)와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)를 사용하였다. Mass 측정은 미국의 University of California, Riverside 부속의 Mass Spectrometry Facility에 의뢰하여 이루어졌으며 IR spectra는 Matton사의 GALAXY 6020 spectrometer를 이용하였다. 그리고 UV spectra는 HP 8453 spectrometer를 이용하였으며 Optical rotation은 $\varnothing 3.5 \times 50\text{mm}$ cell을 이용하여 JASCO사의 DIP-1000 Digital polarimeter로 측정하였다.

2. 4. 2. Gorgonian *Muricella* 속으로부터 분리된 대사물질

2. 4. 2. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속크로마토그래피

Gorgonian *Muricella* spp.의 채집은 제주도 서귀포시 근해(95' 9월) 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌다. 이들 시료는 형태적인 면에서 서로 유사하였으나 표본시료로부터 얻은 조추출물의 TLC 분석 결과가 상이하었으므로 모든 시료(약 95 군체)에 대하여 TLC 분석을 하여 화학적으로 동일한 그룹 (chemotype)으로 재분류(시료번호 95J-16과 95J-18)한 후 형태적인 특성을 조사하였다. 시료 95J-18은 *Muricella* 속(Paramuriceidae)의 형태적 특성을 갖추고 있었으며 *M. perramosa*, *M. nitida*등과 유사하였다. 그러나 branching pattern, calyces의 분포 및 spindle형 spicule의 형태 등에서 이들과 상이하였다. 시료 95J-16은 95J-18과 형태적인 특성이 매우 유사하였으나 polyps의 분포, 작은 calyces의 형태등에서 95J-18과 차이를 나타내었다.

분류된 시료는 채집해 오는 즉시 용달에서 완전히 말려 냉동고(-25°C)에 보관되었다. 냉동 보관중인 시료(건조무게량: 95J-16, 3 kg; 95J-18, 5 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를

가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복하여 얻어진 전체 유기조추출물의 양은 95J-16과 95J-18에 대해서 각각 9.2 g과 11.1 g이 얻어 졌다.

이 조추출물을 각각 진공 silica flash chromatography로 분리하였으며 95J-16은 n-hexane 과 ethylacetate의 혼합액을 100% hexane에서부터 시작하여 EtOAc를 10%씩 첨가하여 100% EtOAc까지 10개의 분획을 얻었으며 95J-18의 경우에는 헥산에 EtOAc를 5%씩 첨가한 혼합용매 와 acetone, methanol을 순서대로 용출시켜 모두 17개의 분획(fraction, fx)을 얻었다. 각 분획의 용매를 제거한 후 ^1H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 95J-16은 fx-2(10%EtOAc/hexane: 1.2 g)와 -3(20% EtOAc/hexane: 550 mg) 그리고 fx-9(80% EtOAc/hexane: 230 mg)에 존재하는 것이 확인되었으며 95J-18에 대해서는 fx-5(20% ethylacetate/n-hexane: 811 mg)와 fx-6(25% ethylacetate/ n-hexane: 560 mg)에 포함되어 있음 이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

2. 4. 2. 2. 95J-16-A(Cladiellin)의 분리

위 normal phase flash chromatography로 분리된 10개 분획 중에서, 10%층과 20%층을 합한 후 steroids와 fatty acids를 제거하기 위하여 Lipophilic Sephadex LH₂₀ Column chromatography를 실시하였다. [Hexane : CCl₄] : EtOH = [2:1]:0.5%을 용매조건으로 하여 매 1 분 간격으로 하여 32개 fraction을 얻어내었다. 이 fraction들에 대해 몇몇 ^1H -NMR spectrum을 확인하여 매우 유사한 것끼리 합쳐 다시 silica HPLC(YMC silica column, 1 cm x 25 cm, 3 ml/min)를 실행하였다. 10% EtOAc : 90% Hexane의 용매 조건을 사용하였다. 이때 HPLC chart 상으로 볼 때 retention time이 12분 정도 지점에 가느다란 선으로 분리된 분액을 가지고 다시 정제를 위해 100% AcCN용매를 사용하여 reversed-phase HPLC를 반복하였다. 이로부터 95% 정도 순수하게 정제된 양을 5mg 정도 분리할 수 있었다.

Cladiellin: White amorphous solid. mp.69-71°C; $[\alpha]_D^{25}$ -3.1°; LREIMS m/z 346(0.2, relative intensity), 288(9), 143(11), 177(19), 147(45), 123(17), 121(21), 93(76), 43(100); ^1H NMR (acetone- d_6 , 500 MHz, -40°C) δ 5.47(1H, br s, H-6), 4.80(1H, br s, H-17), 4.77(1H, br s, H-17), 3.98(1H, br s, H-9), 3.75(3H, s, H-16), 3.70(1H, br s, H-2), 3.04(1H, m, H-10), 2.35(1H, dd, J = 13.7 and 5.3 Hz, H-8), 2.26(1H, ddd, J = 13.7, 3.4, and 3.4 Hz, H-12), 2.18(1H, br d, J = 13.7 Hz, H-12), 2.15(1H, dd, J = 11.8 and 6.8 Hz, H-1), 2.09(2H, m, H-5), 2.05(3H, s, H-22), 2.02-1.97(1H, m, H-8), 1.93-1.87(1H, m, H-18), 1.75(1H, dddd, J = 12.9, 3.4, 3.4, and 3.4 Hz, H-13), 1.44(3H, br s, H-15), 1.33(1H, br dd, J = 12.2 and 12.2 Hz, H-14), 1.01(1H, ddd, J = 12.9, 12.9, and 3.4 Hz, H-13), 0.97(3H, d, J = 6.9 Hz, H-20), 0.77(3H, d, J = 6.9 Hz, H-19); ^{13}C NMR(acetone- d_6 , 125MHz, -40°C) δ 170.47(C, C-21), 147.56(C, C-11), 133.11(CH, C-6),

124.09(C, C-7), 110.70(CH₂, C-17), 91.96(CH, C-2), 86.71(C, C-3), 79.57(CH, C-9), 48.69(CH, C-10), 47.97(CH, C-1), 42.05(CH, C-14), 38.66(CH₂, C-8), 37.35(CH₂, C-4), 31.47(CH₂, C-12), 28.59(CH, C-18), 26.37(CH₂, C-5), 25.70(CH₂, C-13), 24.99(CH₃, C-15), 22.75(CH₃, C-22), 22.25(CH₃, C-20), 21.94(CH₃, C-16), 15.56(CH₃, C-19).

2. 4. 2. 3. 95J-16-B(muricellaxanthin)의 분리

위 normal phase flash chromatography로 분리된 10개 분획 중에서, fx 8(80%EtOAc/n-hexane)층에 ¹H-NMR spectrum으로 볼 때 비교적 분리가 깨끗한 혼합물 20mg 을 얻을 수 있었다. 이 층의 물질에 대해서 10% H₂O: 90% MeOH의 용매를 사용하여 reversed-phase HPLC를 하였다. retention time이 13분인 지점에서 분리된 진한 선홍색깔을 주는 순수 물질이 분리되었다.

Muricellaxanthin: Red amorphous solid. mp. 86-87°C; [α]_D²⁵ -8.9° (c 0.3, MeOH); HRFABMS {M+H}⁺ observed 673.4086, calculated 673.4104; IR(KBr) ν max 3400, 2920, 1930, 1745, 1670, 1600, 1520, 1360, 1220, 1050, 980 cm⁻¹; UV-vis(MeOH) λ max 232, 269, 338, 453 nm; CD(EPA) 243($\Delta \epsilon$ -32.2) 272nm($\Delta \epsilon$ 7.2); ¹H NMR(CDCl₃, 500MHz) δ 7.10(1H, br d, *J* = 11.2 Hz, H-10), 6.77(1H, dd, *J* = 14.5 and 11.5 Hz, H-15'), 6.70(2H, m, H-11', 12), 6.66(1H, dd, *J* = 14.2 and 11.7 Hz, H-15), 6.58(1H, dd, *J* = 14.7 and 11.2 Hz, H-11), 6.46(1H, br d, *J* = 11.7 Hz, H-14), 6.42(1H, d, *J* = 14.9 Hz, H-12'), 6.31(1H, br d, *J* = 11.5 Hz, H-14'), 6.30(1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-10'), 6.04(1H, s, H-8'), 5.83(1H, br s, H-4), 4.81 and 4.75(2H, AB, H-19'), 4.30(1H, m, H-3'), 3.05 and 2.93(2H, AB, H-7), 2.47 and 2.33(2H, AB, H-1), 2.26(2H, br dd, *J* = 12.9 and 4.3 Hz, H-4'), 2.05(3H, s, OAc), 1.99(6H, br s Me-20', 20), 1.95(3H, br s, Me-19), 1.92(1H, m, H-2'), 1.90(3H, d, *J* = 1.4 Hz, Me-18), 1.38(3H, s, Me-18'), 1.34(3H, s, Me-16'), 1.29(1H, dd, *J* = 14.4 and 12.4 Hz, H-2'), 1.09(3H, s, Me-17'), 1.08(3H, s, Me-16), 1.05(3H, s, Me-17); ¹³C NMR(CDCl₃, 125MHz) δ 203.47(C, C-8), 201.75(C, C-7'), 197.67(C, C-3), 170.85(C, Ac-CO), 167.93(C, C-5), 146.96(CH, C-12), 142.11(CH, C-10), 139.89(CH, C-12'), 138.23(C, C-13'), 137.80(CH, C-14), 135.65(C, C-13), 135.06(C, C-9), 133.45(CH, C-14'), 133.01(CH, C-15'), 132.86(CH, C-10'), 130.04(CH, C-15), 129.64(C, C-9'), 125.97(CH, C-4), 124.66(CH, C-11'), 123.25(CH, C-11), 118.52(C, C-6'), 100.83(CH, C-8'), 78.54(C, C-6), 73.01(C, C-5'), 64.29(CH, C-3'), 59.46(CH₂, C-19'), 49.71(CH₂, C-2), 49.43(CH₂, C-2'), 48.96(CH₂, C-4'), 42.02(C, C-1), 38.64(CH₂, C-7), 36.06(C, C-1'), 31.89(CH₃, C-17'), 31.02(CH₃, C-18'), 29.17(CH₃, C-16'), 24.86(CH₃, C-17), 23.24(CH₃, C-16), 21.08(CH₃, Ac-CH₃), 20.75(CH₃, C-18), 12.97(CH₃, C-20), 12.71(CH₃, C-20'), 11.65(CH₃, C-19).

2. 4. 2. 4. 95J-18-A(Calicoferol D)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(811 mg)을 12% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 semi-prep HPLC(YMC silica column, 1 cm x 25 cm, RI detector)로 분리하여 retention time 15 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 다시 reversed- HPLC(YMC C₁₈ column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 27 분에 대사물질 95J-18-A의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 7.5 mg이었다.

Calicoferol D: Colorless oil; LREIMS m/z (relative intensity) 410(30), 276(65), 261(13), 205(10), 151(51), 134(100), 121(40), 109(16), 93(30), 83(19); IR(KBr) 3400(OH), 2960, 2870, 1700, 1610, 1590, 1500, 1370, 1300, 1230, 1160, 980, 810 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.9 nm(ϵ 6900), 280.9 nm(ϵ 2200); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.98(1H, d, J = 7.8 Hz, H-1), 6.66(1H, d, J = 2.9 Hz, H-4), 6.57(1H, dd, J = 7.8 and 2.9 Hz, H-2), 5.22(1H, dd, J = 15.1 and 8.0 Hz, H-23), 5.15(1H, dd, J = 15.1 and 8.3 Hz, H-22), 2.65(1H, ddd, J = 13.0, 12.2, and 4.9 Hz, H-6), 2.50(1H, ddd, J = 14.2, 14.2, and 6.8 Hz, H-11), 2.42(1H, ddd, J = 13.0, 11.5, and 5.4 Hz, H-6), 2.37(1H, m, H-8), 2.32(1H, ddd, J = 14.2, 5.1, and 2.0 Hz, H-11), 2.25(3H, s, H-19), 2.14(1H, ddd, J = 13.2, 6.8, and 2.0 Hz, H-12), 2.08(1H, m, H-20), 1.84(2H, m, H-16, -24), 1.75(1H, m, H-7), 1.69(2H, m, H-14, -15), 1.59(2H, m, H-7, -12), 1.47(1H, m, H-25), 1.42(1H, m, H-16), 1.28(1H, m, H-15), 1.26(1H, m, H-17), 1.02(3H, d, J = 6.8 Hz, H-21), 1.00(3H, s, H-18), 0.92(3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.84(3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.82(3H, d, J = 6.6 Hz, H-27); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 213.00(C, H-9), 153.56(C, C-3), 142.53(C, C-5), 135.22(CH, C-22), 132.50(CH, C-23), 130.99(CH, C-1), 128.07(C, C-10), 115.47(CH, C-4), 112.45(CH, C-2), 55.28(CH, C-14), 54.86(CH, C-17), 50.43(CH, C-8), 43.05(CH, C-24), 42.69(C, C-13), 40.15(CH, C-20), 38.37(CH₂, C-12), 38.28(CH₂, C-11), 33.18(CH, C-25), 31.00(CH₂, C-6), 29.64(CH₂, C-16), 27.62(CH₂, C-7), 25.17(CH₂, C-15), 20.16(CH₃, C-26), 20.94(CH₃, C-21), 19.66(CH₃, C-27), 18.37(CH₃, C-19), 18.00(CH₃, C-28), 11.72(CH₃, C-18).

2. 4. 2. 5. 95J-18-B(Calicoferol E)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(811 mg)을 12% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC silica column, RI detector)로 분리하여 retention time 15 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 다시 reversed-phase HPLC(YMC C₁₈ column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 27 분에 대사물질 95J-18-B의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 8.5 mg이었다.

Calicoferol E: LREIMS m/z (relative intensity) 398(40), 264(37), 249(14), 193(29), 180(12), 151(100), 134(94), 121(50), 109(27); IR(KBr) 3400(OH), 2950, 2870, 1700, 1610, 1590, 1500, 1460, 1230, 1160, 820 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.4 nm(ϵ 7400), 282.0 nm(ϵ 2500); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.97(1H, d, J = 8.3 Hz, H-1), 6.66(1H, d, J = 2.9 Hz, H-4), 6.57(1H, dd, J = 8.3 and 2.9 Hz, H-2), 2.66(1H, ddd, J = 13.2, 11.7, and 4.9 Hz, H-6), 2.50(1H, ddd, J = 14.7, 13.7, and 6.8 Hz, H-11), 2.41(1H, ddd, J = 13.2, 11.7, and 5.4 Hz, H-6), 2.36(1H, m, H-8), 2.31(1H, ddd, J = 14.2, 5.4, and 2.0 Hz, H-11), 2.25(3H, s, H-19), 2.17(1H, ddd, J = 12.9, 6.8, and 2.3 Hz, H-12), 1.98(1H, m, H-16), 1.75(1H, m, H-7), 1.69(2H, m, H-14, -15), 1.59(2H, m, H-7, -12), 1.54(1H, m, H-25), 1.43(2H, m, H-16, -20), 1.34(2H, m, H-22, -23), 1.29(1H, m, H-15), 1.21(1H, m, H-17), 1.16(1H, m, H-23), 1.13(2H, m, H-24), 1.01(1H, m, H-22), 0.98(3H, s, H-18), 0.93(3H, d, J = 6.8 Hz, H-21), 0.88(3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.87(3H, d, J = 6.8 Hz, H-27); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 213.20(C, H-9), 153.62(C, C-3), 142.53(C, C-5), 130.99(CH, C-1), 128.04(C, C-10), 115.66(CH, C-4), 112.47(CH, C-2), 55.23(CH, C-14), 55.07(CH, C-17), 50.43(CH, C-8), 42.83(C, C-13), 39.45(CH_2 , C-24), 35.64(CH, C-20), 38.51(CH_2 , C-12), 38.29(CH_2 , C-11), 35.88(CH_2 , C-22), 31.02(CH_2 , C-6), 29.05(CH_2 , C-16), 28.01(CH, C-25), 27.65(CH_2 , C-7), 25.13(CH_2 , C-15), 23.79(CH_2 , C-23), 22.81(CH_3 , C-26), 22.55(CH_3 , C-27), 18.56(CH_3 , C-21), 18.37(CH_3 , C-19), 11.53(CH_3 , C-18).

2. 4. 2. 6. 95J-18-C의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-6(560 mg)을 15% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 semi-prep HPLC(YMC silica column, RI detector)로 분리하여 retention time 25 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 이들을 다시 reversed-phase HPLC(YMC C_{18} column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 14 분에 대사물질 95J-18-C의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 2.8 mg이었다.

95J-18-C: colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +18.4^{\circ}$ (c 0.1, CHCl_3); HREIMS: (M)⁺ observed 414.3135, calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$, 414.3134; LREIMS m/z (relative intensity) 414(21), 280(23), 265(45), 221(30), 208(9), 134(76), 121(43), 109(10), 91(18), 81(16), 69(25), 55(45), 43(100); IR(KBr) 3400(OH), 2950, 2920, 2860, 1700(C=O), 1610, 1590, 1470, 1380, 1300, 1260, 1160, 1110, 1035, 875, 800, 750 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.2 nm(ϵ 6700), 282.7 nm(ϵ 2100); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.99(1H, d, J = 8.1 Hz, H-1), 6.66(1H, d, J = 2.8 Hz, H-4), 6.58(1H, dd, J = 8.1 and 2.8

Hz, H-2), 4.45(1H, ddd, $J = 7.8, 6.8,$ and 4.2 Hz, H-16), 2.66(1H, ddd, $J = 13.2, 13.2,$ and 4.9 Hz, H-6), 2.51(1H, ddd, $J = 13.7, 13.7,$ and 6.8 Hz, H-11), 2.45(1H, m, H-8), 2.43(1H, ddd, $J = 13.2, 13.2,$ and 5.7 Hz, H-6), 2.35(1H, br dd, $J = 13.2$ and 7.8 Hz, H-15), 2.32(1H, ddd, $J = 13.7, 5.6,$ and 2.1 Hz, H-11), 2.25(3H, s, H-19), 2.17(1H, ddd, $J = 13.0, 6.8,$ and 2.1 Hz, H-12), 1.93(1H, m, H-20), 1.77(1H, m, H-7), 1.56(1H, m, H-7), 1.54(1H, m, H-25), 1.53(1H, ddd, $J = 13.7, 13.0,$ and 5.6 Hz, H-12), 1.51(1H, m, H-14), 1.50(1H, m, H-22), 1.44(1H, m, H-23), 1.42(1H, ddd, $J = 13.2, 13.2,$ and 4.2 Hz, H-15), 1.18(3H, s, H-18), 1.25(1H, m, H-23), 1.15(2H, m, H-24), 1.10(1H, dd, $J = 10.8$ and 6.8 Hz, H-17), 1.10(1H, m, H-22), 0.88(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.87(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 212.38(C, C-9), 153.53(C, C-3), 142.35(C, C-5), 131.02(CH, C-1), 128.06(C, C-10), 115.64(CH, C-4), 112.50(CH, C-2), 72.80(CH, H-16), 60.51(1H, C-17), 52.73(CH, C-14), 50.01(CH, C-8), 42.71(C, C-13), 39.45(CH_2 , C-24), 38.79(CH_2 , C-12), 38.02(CH_2 , C-11), 37.03(CH_2 , C-15), 36.08(CH_2 , C-22), 31.06(CH_2 , C-6), 29.61(CH, C-20), 28.10(CH, C-25), 27.72(CH_2 , C-7), 24.18(CH_2 , C-23), 22.81(CH_3 , C-26), 22.59(CH_3 , C-27), 18.41(CH_3 , C-21), 17.96(CH_3 , C-19), 12.70(CH_3 , C-18).

2. 4. 2. 7. 95J-18-D의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(811 mg)을 12% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 semi-prep HPLC(YMC silica column, RI detector)로 분리하여 retention time 14 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 이를 다시 reversed-phase HPLC(YMC C_{18} column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 15 분에 대사물질 95J-18-D의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 2.1 mg이었다.

95J-18-D: colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +13.7^\circ$ (c 0.1, CHCl_3); HRCIMS: $(\text{M}+\text{H})^+$ observed 413.3423, calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_3$, 413.3420; LRCIMS m/z (relative intensity) 413(28), 397(6), 377(5), 281(5), 269(7), 260(5), 233(4), 173(5), 163(9), 147(22), 134(100), 121(34), 107(15), 97(13), 91(14), 81(15), 69(29), 55(43), 43(30); IR(KBr) 3400(OH), 2960, 2920, 2860, 1610, 1590, 1500, 1460, 1370, 1270, 1160, 1020, 970, 740 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.7 nm(ϵ 6400), 279.4 nm(ϵ 2400); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.98(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-1), 6.65(1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-4), 6.57(1H, dd, $J = 8.1$ and 2.8 Hz, H-2), 5.19(1H, dd, $J = 15.6$ and 6.4 Hz, H-23), 5.14(1H, dd, $J = 15.6$ and 6.6 Hz, H-22), 4.04(1H, m, H-9), 2.70(1H, ddd, $J = 13.2, 11.2,$ and 5.4 Hz, H-6), 2.42(1H, ddd, $J = 12.7, 11.2,$ and 5.4 Hz, H-6), 2.22(3H, s, H-19), 2.01(1H, m, H-20), 1.82(1H, m, H-24), 1.75(1H, m, H-12), 1.75(2H, m, H-11), 1.68(1H, m, H-16), 1.60(1H, m, H-15), 1.51(3H, m, H-7, H-14), 1.50(1H, m, H-12), 1.49(1H, m, H-8), 1.46(1H, m, H-25), 1.25(1H, m,

H-17), 1.22(1H, m, H-16), 1.01(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.00(1H, m, H-15), 0.91(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-17), 0.83(3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-26), 0.82(3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-27), 0.70(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 153.55(C, C-3), 142.65(C, C-5), 135.84(CH, C-23), 131.90(CH, C-22), 130.98(CH, C-1), 127.88(C, C-10), 115.45(CH, C-4), 112.37(CH, C-2), 67.25(CH, H-9), 56.00(CH, C-17), 47.85(CH, C-14), 43.04(CH, C-24), 42.81(C, C-13), 40.93(CH, C-8), 34.06(CH_2 , C-12), 33.23(CH, C-25), 30.30(CH_2 , C-6), 30.15(CH_2 , C-7), 29.69(CH_2 , C-11), 28.31(CH_2 , C-16), 24.52(CH_2 , C-15), 21.04(CH_3 , C-21), 20.17(CH_3 , C-26), 19.69(CH_3 , C-27), 18.40(CH_3 , C-19), 18.04(CH_3 , C-28), 11.27(CH_3 , C-18).

2. 4. 2. 8. 95J-18-E의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-6(560 mg)을 15% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica cartridge filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 semi-prep HPLC(YMC silica column, RI detector)로 분리하여 retention time 28 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 이를 다시 reversed-phase HPLC(YMC C_{18} column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 19 분에 대사물질 95J-18-E의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 2.2 mg이었다.

95J-18-E: colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -6.6^\circ$ (c 0.1, CHCl_3); HREIMS: $[\text{M}]^+$ observed 384.3023, calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_2$, 384.3028; LREIMS m/z (relative intensity) 384(40), 366(5), 349(4), 269(7), 242(4), 229(4), 173(8), 161(5), 147(14), 134(100), 121(59), 107(13), 97(26), 81(17), 69(21), 55(43), 43(29); IR(KBr) 3360(OH), 2955 2920, 2880, 1610, 1590, 1500, 1460, 1370, 1290, 1260, 1160, 970, 870, 810, 740cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.5 nm(ϵ 6900), 281.3 nm(ϵ 2100); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.98(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1), 6.65(1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 6.57(1H, dd, $J = 8.3$ and 2.5 Hz, H-2), 5.27(1H, dd, $J = 15.6$ and 6.6 Hz, H-23), 5.16(1H, dd, $J = 15.6$ and 8.3 Hz, H-22), 4.04(1H, m, H-9), 2.71(1H, ddd, $J = 13.2$, 11.5, and 5.1 Hz, H-6), 2.42(1H, ddd, $J = 13.2$, 10.7, and 5.4 Hz, H-6), 2.22(3H, s, H-19), 2.19(1H, m, H-24), 2.00(1H, m, H-20), 1.75(2H, m, H-11), 1.71(1H, m, H-12), 1.65(1H, m, H-16), 1.56(1H, m, H-15), 1.53(1H, m), 1.52(3H, m, H-7, H-14), 1.51(1H, m, H-12), 1.23(1H, m, H-16), 1.20(1H, m, H-17), 1.08(1H, m, H-15), 1.00(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-16), 0.94(6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-25, H-26), 0.70(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 153.72(C, C-3), 142.61(C, C-5), 130.99(CH, C-1), 127.74(C, C-10), 115.47(CH, C-4), 112.44(CH, C-2), 67.31(CH, H-9), 56.13(CH, C-17), 47.74(CH, C-14), 42.83(C, C-13), 40.87(CH, C-8), 39.47(CH_2 , C-24), 36.10(CH_2 , C-22), 35.74(CH, C-20), 34.09(CH_2 , C-12), 30.80(CH_2 , C-6), 30.22(CH_2 , C-7), 30.02(CH_2 , C-11), 27.99(CH, C-25), 27.71(CH_2 , C-16), 24.41(CH_2 , C-15), 23.75(CH_2 , C-23), 22.80(CH_3 , C-26), 22.55(CH_3 , C-27),

18.65(CH₃, C-21), 18.35(CH₃, C-19), 10.99(CH₃, C-18).

2. 4. 2. 9. 95J-18-F의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-6(560 mg)을 15% EtOAc/hexane에 녹이고 Maxi-clean silica filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 semi-prep HPLC(YMC silica column, RI detector)로 분리하여 retention time 25 분(3 ml/min)에 나오는 peak를 모으고 이를 다시 reversed-phase HPLC(YMC C₁₈ column, acetonitrile, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 22 분에 대사물질 95J-18-F의 peak가 나타났으며 분리한 전체량은 2.6 mg이었다.

95J-18-F: colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -7.5^{\circ}$ (c 0.1, CHCl₃); HREIMS: [M]⁺ observed 398.3199, calculated for C₂₇H₄₂O₂, 398.3185; LREIMS m/z(relative intensity) 398(14), 365(5), 296(3), 269(8), 246(6), 201(4), 173(7), 161(8), 147(24), 134(100), 121(52), 107(16), 93(13), 79(19), 69(44), 55(37), 44(60); IR(KBr) 3400(OH), 2920, 2860, 1610, 1590, 1460, 1360, 1270, 1160, 895, 740, 710 cm⁻¹; UV(MeOH) λ_{max} 218.3 nm(ϵ 7000), 281.3 nm(ϵ 2400); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.98(1H, d, J = 7.8 Hz, H-1), 6.65(1H, d, J = 2.5 Hz, H-4), 6.57(1H, dd, J = 7.8 and 2.5 Hz, H-2), 5.09(1H, tt, J = 6.8 and 1.5 Hz, H-24), 4.04(1H, m, H-9), 2.71(1H, ddd, J = 13.2, 11.2, and 5.4 Hz, H-6), 2.42(1H, ddd, J = 13.2, 11.5, and 5.1 Hz, H-6), 2.22(3H, s, H-19), 1.83(1H, m, H-16), 1.77(1H, m, H-12), 1.75(2H, m, H-11), 1.68(3H, s, H-26), 1.60(3H, s, H-27), 1.58(1H, m, H-15), 1.57(1H, m, H-23), 1.52(3H, m, H-7, -14), 1.50(1H, m, H-8), 1.49(1H, m, H-12), 1.40(2H, m, H-20, -22), 1.23(1H, m, H-16), 1.21(1H, m, H-17), 1.08(1H, m, H-23), 1.06(1H, m, H-22), 1.19(1H, m, H-17), 0.94(3H, d, J = 6.8 Hz, H-21), 0.69(3H, s, H-18); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 153.43(C, C-3), 142.67(C, C-5), 130.97(CH, C-1), 130.97(C, C-25), 127.90(C, C-10), 125.10(CH, C-24), 115.43(CH, C-4), 112.35(CH, C-2), 67.18(CH, H-9), 56.09(CH, C-17), 47.76(CH, C-14), 42.92(C, C-13), 40.91(CH, C-8), 36.07(CH₂, C-22), 35.59(CH, C-20), 34.14(CH₂, C-12), 30.89(CH₂, C-6), 30.31(CH₂, C-7), 30.18(CH₂, C-11), 27.74(CH₂, C-16), 24.48(CH₂, C-15), 24.67(CH₂, C-23), 25.76(CH₃, C-26), 18.63(CH₃, C-21), 18.40(CH₃, C-19), 17.68(CH₃, C-27), 11.06(CH₃, C-18).

2. 4. 3. Gorgonian *Euplexaura anastomosans*로부터 분리된 대사물질

2. 4. 3. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속크로마토그래피

본 연구에 사용된 산호 *Euplexaura anastomosans*(시료번호 91K-1)는 1991년 거문도 연안

해역 수심 25-30 mm에서 SCUBA 다이빙에 의해 채집되었다. 이 시료는 현장에서 그늘에 말린 후 변질을 막기 위해 드라이아이스로 냉동한 후 항공운송되어 냉동고 (-25°C)에서 보관되었다. 건조 냉동 보관된 이 시료(건조 무게 5kg)는 효과적인 추출을 위해 2-3cm 정도로 잘게 잘라 유기 용매 (methylene chloride 1.5 L와 methanol 1.5 L)를 순차적으로 가하여 실온에서 각 용매에서 48시간 후에 추출하였다. 이 과정을 두번 정도 거듭하여 얻었으며 이때 dichloromethane에서 추출된 양은 총 30g에 이르며 methanol 에서는 10g정도 유기추출물을 각각 얻을 수 있었다. 이중 dichloromethane 추출물의 약1/3에 대해 다음과 같은 조건으로 silica column flash vacuum chromatography를 실행하였다: 100% hexane(500ml), 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% EtOAc in hexane(500ml), 100% EtOAc(500ml), 100% acetone(500ml), 100% methanol(500ml). 이렇게 얻어진 각 분액들을 ¹H NMR로 측정한 결과 30%-45% EtOAc/hexane 층에 sterol계로 추정되는 물질들을 확인할 수 있었다.

2. 4. 3. 2. Anastomosacetals A-D의 분리

위 normal phase flash chromatography로 분리된 10개 분획 중에서, 먼저 30% EtOAc/hexane층에 대해서 25% EtOAc : 75% hexane의 용매조건으로 YMC silica column을 사용하여 semi-prep HPLC를 거친 후 최종 정제를 위해 다시 100% AcCN로 YMC ODS column을 이용한 reversed-phase HPLC에 의하여 anastomosacetals C와 D를 분리할 수 있었다. 그리고 35% EtOAc/hexane층에서 대해서도 같은 조건의 용매를 사용하여 silica HPLC를 하고 난 후 최종 정제를 위하여 80% AcCN : 20 % methanol의 용매로 reversed-phase column HPLC를 실시하였다. 이 단계에서는 순수한 anastomosacetal B를 분리할 수 있었다. 나머지 한 화합물 (anastomosacetal A)은 45% EtOAc/hexane층에 대하여 30% EtOAc : 70% hexane으로 먼저 silica semi-prep HPLC를 하고 난후 15% H₂O : 85% methanol조건으로 reversed-phase ODS HPLC를 실시하여 순수한 물질을 분리할 수 있었다.

Anastomosacetal A(91K-1-1): white solid, mp. 134-136°C; $[\alpha]_D^{25} +22.3^{\circ}$ (c 0.4, MeOH); HRFABMS {M+H}⁺ observed 429.2997, calculated for C₂₇H₃₈O₄, 429.3005; IR(KBr) ν max 3400, 2930, 2870, 1660, 1460, 1120, 1095, 990 cm⁻¹; UV(MeOH) λ max 244 nm (ϵ 17500); ¹H NMR(CDC₃, 500 MHz) δ 7.05(1H, d, J = 10.0 Hz, H-1), 6.22(1H, dd, J = 10.0 and 2.0 Hz, H-2), 6.07(1H, br s, H-4), 5.50(3H, br s, H-21), 3.60(1H, ddd, J = 11.7, 6.4, and 2.0 Hz, H-24), 3.48(1H, s, OH-17), 2.93(1H, br s, OH-21), 2.46(1H, ddd, J = 13.4, 13.2, and 4.2 Hz, H-6), 2.36(1H, ddd, J = 13.4, 3.0, and 3.0 Hz, H-6), 2.02(1H, dddd, J = 13.2, 13.2, 12.7, and 3.5 Hz, H-22), 1.95(1H, m, H-7), 1.89(1H, ddd, J = 12.7, 3.4, and 2.9 Hz, H-20), 1.76(1H, m, H-14), 1.74(2H, m, H-12, H-23), 1.71(2H, m, H-11), 1.67(2H, m, H-16), 1.64(1H, m, H-8), 1.62(2H, m, H-15, H-22), 1.60(1H, m, H-25), 1.54(1H, m, H-12), 1.33(1H, dddd, J = 13.2, 13.2, 11.7, and 3.9

Hz, H-23), 1.24(3H, s, Me-19), 1.17(1H, m, H-15), 1.10(1H, m, H-7), 1.08(1H, ddd, $J = 11.7$, 11.7, and 3.9 Hz, H-9), 0.91(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-26), 0.88(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-27), 0.87(3H, s, Me-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.41(C, C-3), 169.27(C, C-5), 155.81(CH, C-1), 127.49(CH, C-2), 123.83(CH, C-4), 93.14(CH, C-21), 84.03(C, C-17), 73.51(CH, C-24), 51.81(CH, C-9), 49.38(CH, C-14), 47.58(C, C-13), 44.53(CH, C-20), 43.55(C, C-10), 36.80(CH_2 , C-16), 35.70(CH, C-8), 33.61(CH_2 , C-7), 32.93(CH_2 , C-6), 32.66(CH, C-25), 32.24(CH_2 , C-12), 28.17(CH_3 , C-23), 23.48(CH_2 , C-15), 22.72(CH_2 , C-11), 19.47(CH_2 , C-22), 18.74(CH_3 , C-19), 18.65(CH_3 , C-26), 18.36(CH_3 , C-27), 14.76(CH_3 , C-18).

Anastomosacetal B (**91K-1-2**): white solid, mp. 107-108°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +15.6^{\circ}$ (c 0.3, MeOH); HRFABMS $\{\text{M}+\text{H}\}^+$ observed 431.3169, calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_4$, 431.3161; IR(KBr) ν max 3450, 2930, 2870, 1680, 1630, 1440, 1370, 1170, 1095 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ max 230.0nm (ϵ 14000); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.13(1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-1), 5.85(1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-2), 5.51(1H, br s, H-21), 3.61(1H, ddd, $J = 11.7$, 6.4, and 2.0 Hz, H-24), 3.47(1H, s, OH-17), 2.92(1H, br s, OH-21), 2.36(1H, dd, $J = 18.1$ and 14.2 Hz, H-4), 2.22(1H, br dd, $J = 18.1$ and 3.9 Hz, H-4), 2.01(1H, dddd, $J = 13.2$, 13.2, 12.7, and 3.9 Hz, H-22), 1.92(1H, m, H-5), 1.88(1H, m, H-20), 1.82(1H, m, H-11), 1.78(1H, m, H-14), 1.75(1H, m, H-12), 1.72(1H, m, H-23), 1.69(3H, m H-7, H-16, H-16), 1.65(1H, m, H-15), 1.61(2H, m, H-22, H-25), 1.57(1H, m, H-12), 1.50(1H, m, H-8), 1.46-1.41(3H, m, H-6, H-6, H-11), 1.34(1H, dddd, $J = 13.2$, 13.2, 11.7, and 3.9 Hz, H-23), 1.10(1H, m, H-15), 1.02(2H, m, H-7, H-9), 1.00(3H, s, Me-19), 0.93(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-26), 0.88(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-27), 0.84(3H, s, Me-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 200.25(C, C-3), 158.44(CH, C-1), 127.41(CH, C-2), 93.22(CH, C-21), 84.14(C, C-17), 73.51(CH, C-24), 50.21(CH, C-14), 49.43(CH, C-9), 47.64(C, C-13), 44.61(CH, C-20), 44.22(CH, C-5), 40.97(CH_2 , C-4), 38.91(C, C-10), 36.93(CH_2 , C-16), 35.80(CH, C-8), 32.65(CH, C-25), 32.46(CH_2 , C-12), 31.22(CH_2 , C-7), 28.18(CH_2 , C-23), 27.63(CH_2 , C-6), 23.19(CH_3 , C-15), 21.15(CH_2 , C-11), 19.48(CH_2 , C-22), 18.65(CH_3 , C-26), 18.36(CH_3 , C-27), 14.90(CH_3 , C-18), 12.98(CH_3 , C-19).

Anastomosacetal C (**91K-1-3**): white solid, mp. 187-188°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +23.3^{\circ}$ (c 0.3, MeOH); HRFABMS $\{\text{M}+\text{H}\}^+$ observed 431.3156, calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_4$, 431.3161; IR(KBr) ν max 3400, 2920, 2870, 1665, 1615, 1460, 1385, 1240, 1125, 1100, 1000 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ max 241nm (ϵ 18000); ^1H NMR(C_6D_6 , 500 MHz) δ 5.83(1H, br s, H-4), 5.25(1H, br s, H-21), 3.57(1H, br dd, $J = 11.7$ and 6.2 Hz, H-24), 3.44(1H, s, OH-17), 3.00(1H, br s, OH-21), 2.31(1H, br ddd, $J = 16.6$, 3.9, and 3.4 Hz, H-2), 2.20(1H, ddd, $J = 16.6$, 14.7, and 4.9 Hz, H-2), 2.14(1H, br ddd, $J = 13.1$, 12.7, and 12.7 Hz, H-22), 1.93(1H, dddd, $J = 14.2$, 13.8, 4.4, and 1.9 Hz, H-6), 1.84(1H,

m, H-6), 1.79(1H, m, H-14), 1.75(2H, m, H-16, H-20), 1.65(1H, m, H-25), 1.60(1H, m, H-15), 1.57(3H, m, H-1, H-12, H-23), 1.54(2H, m, H-16, H-22), 1.48(1H, m, H-7), 1.34(1H, m, H-1), 1.29(1H, m, H-11), 1.22(1H, m, H-12), 1.18(1H, m, H-23), 1.16(1H, m, H-8), 1.12(1H, m, H-11), 1.04(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-26), 0.93(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-27), 0.89(1H, m, H-15), 0.78(1H, m, H-7), 0.77(3H, s, Me-19), 0.66(1H, ddd, $J = 11.7, 11.2,$ and 3.4 Hz, H-9), 0.57(3H, s, Me-18); ^{13}C NMR(C_6D_6 , 125MHz) δ 196.92(C, C-3), 168.54(CH, C-5), 124.18(CH, C-4), 93.17(CH, C-21), 83.79(C, C-17), 73.12(CH, C-24), 53.34(CH, C-9), 49.93(CH, C-14), 47.40(C, C-13), 45.04(CH, C-20), 38.34(C, C-10), 37.14(CH_2 , C-16), 35.89(CH_2 , C-1), 35.83(CH, C-8), 34.33(CH_2 , C-12), 32.75(CH_2 , C-6), 33.16(CH, C-25), 32.48(CH_2 , C-12), 32.16(CH_2 , C-7), 28.76(CH_2 , C-23), 23.66(CH_2 , C-15), 21.08(CH_2 , C-11), 19.98(CH_2 , C-22), 18.80(CH_3 , C-26), 18.72(CH_3 , C-27), 17.13(CH_3 , C-19), 14.70(CH_3 , C-18).

Anastomosacetal D(91K-1-4): white solid, mp. 75-76°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -9.1^{\circ}$ (c 0.5, MeOH); HRFABMS $(\text{M}+\text{H})^+$ observed 433.3327, calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_4$, 433.3318; IR(KBr) ν max 3400, 2920, 2860, 1710, 1620, 1435, 1390, 1225, 1170, 1100 cm^{-1} ; UV(MeOH) no λ max; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.51(1H, br s, H-21), 3.60(1H, ddd, $J = 11.7, 6.4,$ and 2.0 Hz, H-24), 3.45(1H, s, OH-17), 3.03(1H, br s, OH-21), 2.37(1H, ddd, $J = 15.6, 13.7,$ and 6.3 Hz, H-2), 2.29(1H, dddd, $J = 15.6, 4.9, 2.4,$ and 2.4 Hz, H-2), 2.26(1H, dd, $J = 14.7$ and 14.2 Hz, H-4), 2.07(1H, ddd, $J = 14.7, 3.9,$ and 2.0 Hz, H-4), 2.01(2H, m, H-1, H-22), 1.88(1H, ddd, $J = 12.7, 2.4,$ and 2.4 Hz, H-20), 1.76(1H, m, H-14), 1.72(1H, m, H-23), 1.71-1.65(4H, m, H-7, H-15, H-16, H-16), 1.62(1H, m, H-11), 1.60(2H, m, H-22, H-25), 1.58(2H, m, H-12), 1.53(1H, m, H-5), 1.43(1H, dddd, $J = 11.7, 10.7, 10.7,$ and 3.9 Hz, H-8), 1.38(1H, m, H-11), 1.37-1.26(4H, m, H-1, H-6, H-6, H-23), 1.09(1H, m, H-15), 1.01(3H, s, Me-19), 0.96(1H, dddd, $J = 12.7, 12.2, 12.2,$ and 4.9 Hz, H-7), 0.91(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-26), 0.88(3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-27), 0.81(3H, s, Me-18), 0.78(1H, ddd, $J = 12.2, 10.7,$ and 3.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 212.08(C, C-3), 93.21(CH, C-21), 84.28(C, C-17), 73.48(CH, C-24), 53.28(CH, C-9), 50.17(CH, C-14), 47.53(C, C-13), 46.60(CH, C-5), 44.68(CH_2 , C-4), 44.61(CH, C-20), 38.53(CH_2 , C-1), 38.20(CH_2 , C-2), 36.93(CH_2 , C-16), 35.60(C, C-10), 35.55(CH, C-8), 32.65(CH, C-25), 32.52(CH_2 , C-12), 31.64(CH_2 , C-7), 28.94(CH_2 , C-6), 28.19(CH_2 , C-23), 23.31(CH_2 , C-15), 21.33(CH_2 , C-11), 19.49(CH_2 , C-22), 18.66(CH_3 , C-26), 18.35(CH_3 , C-27), 14.80(CH_3 , C-18), 11.47(CH_3 , C-19).

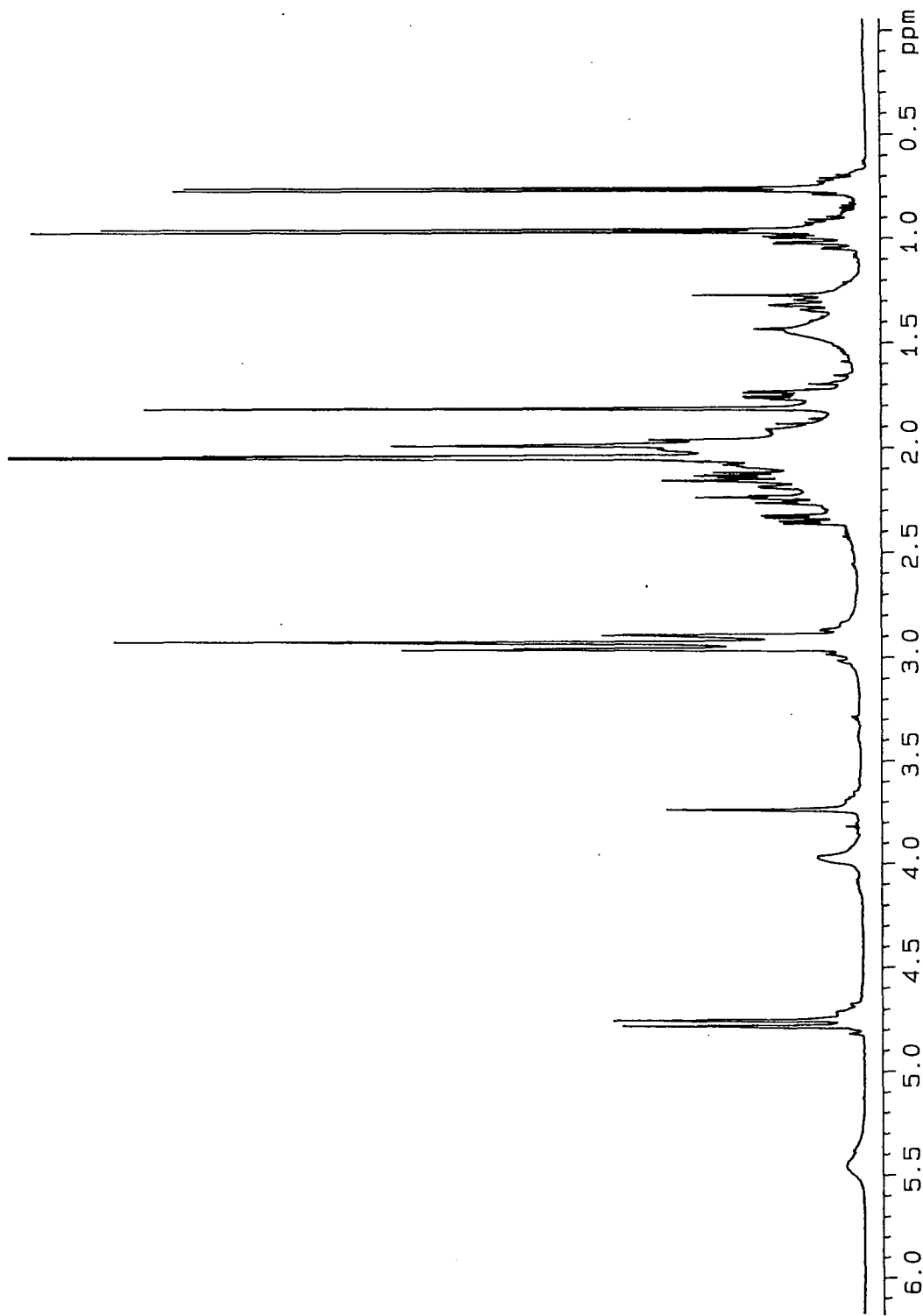


Fig. 2-9. Proton NMR spectrum of cladiellin.

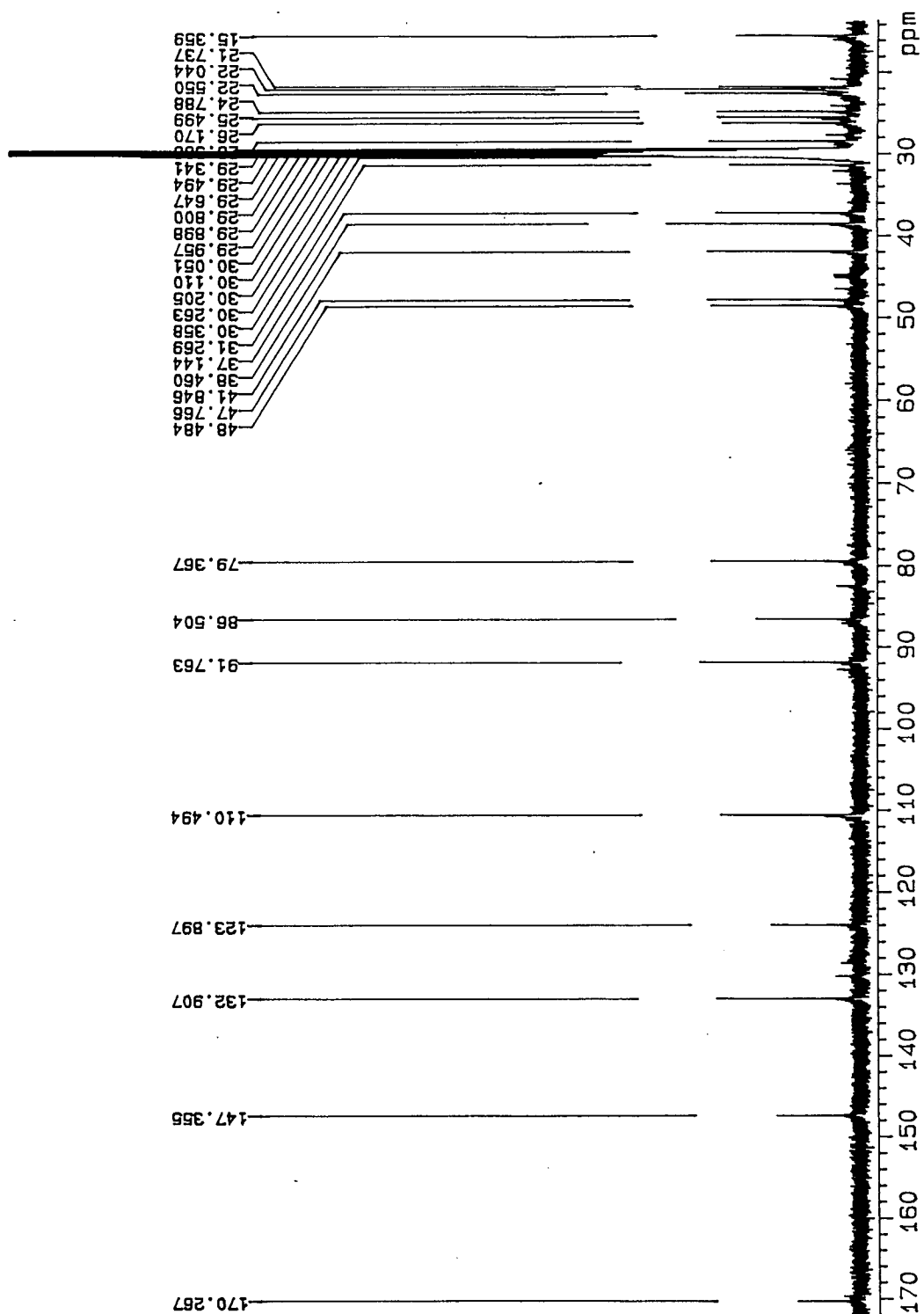


Fig. 2-10. Carbon NMR spectrum of cladiellin.

92J-16-80XEtOAc-P

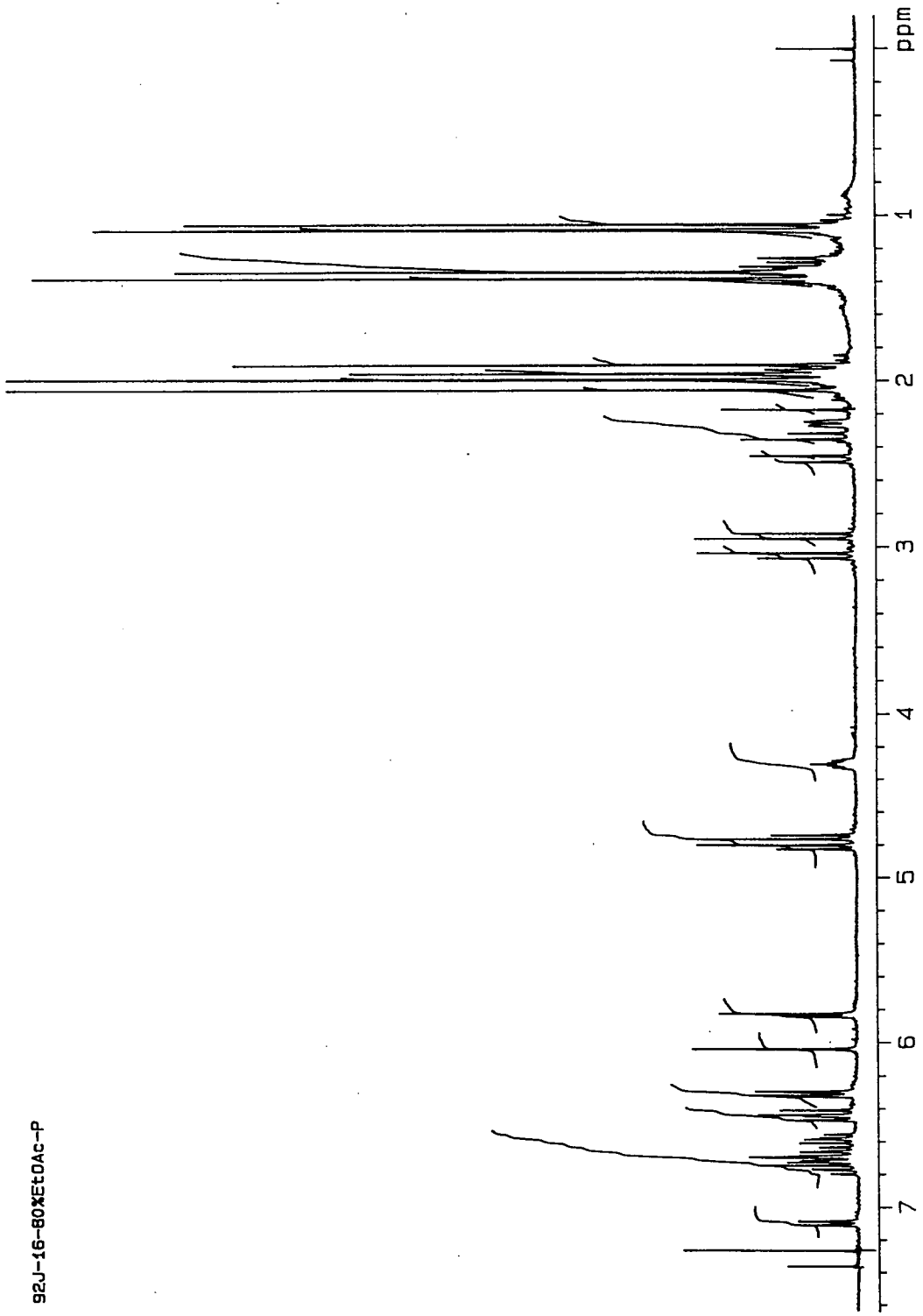


Fig. 2-11. Proton NMR spectrum of muricellaxanthin.

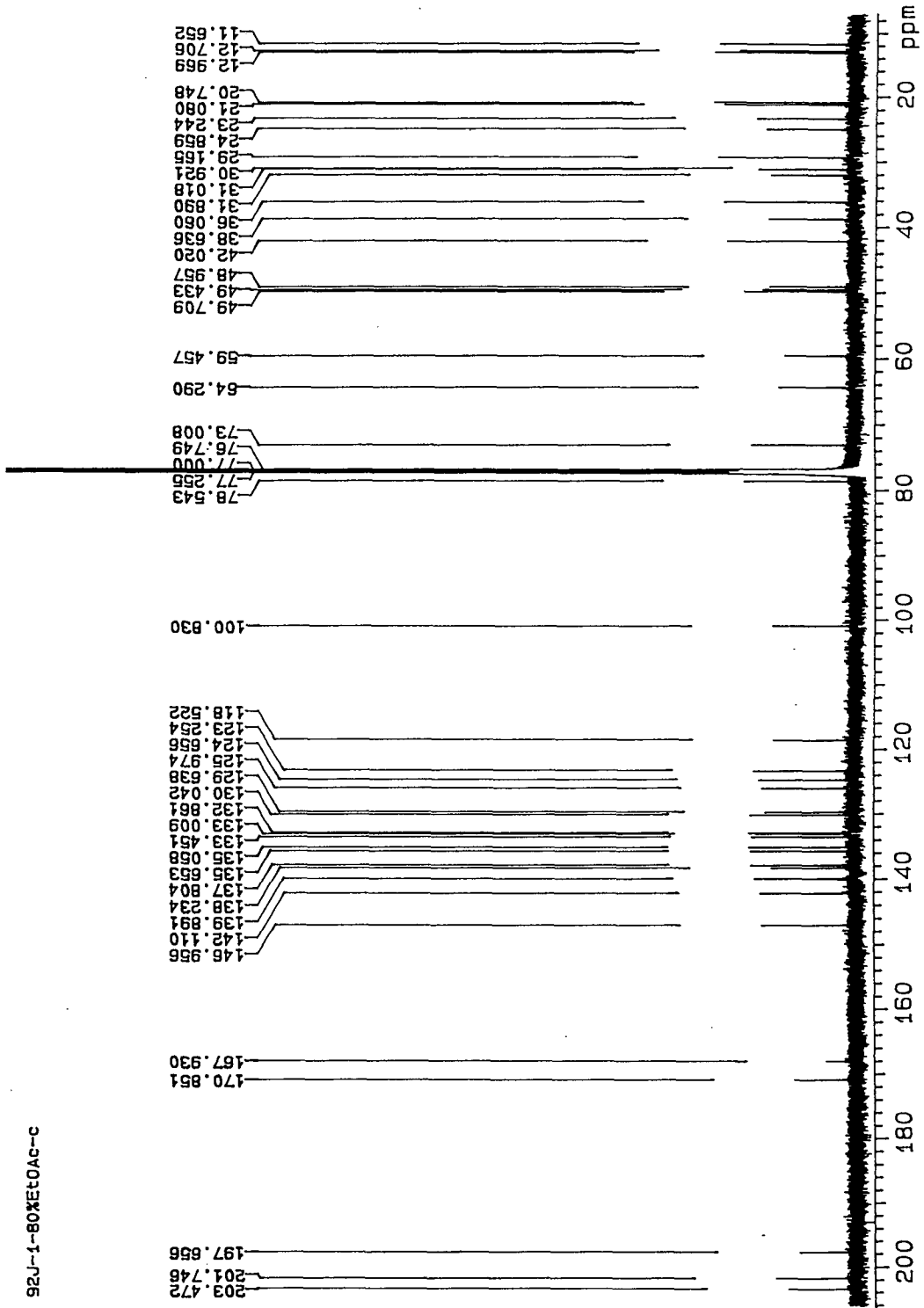


Fig. 2-12. Carbon NMR spectrum of muricellaxanthin.

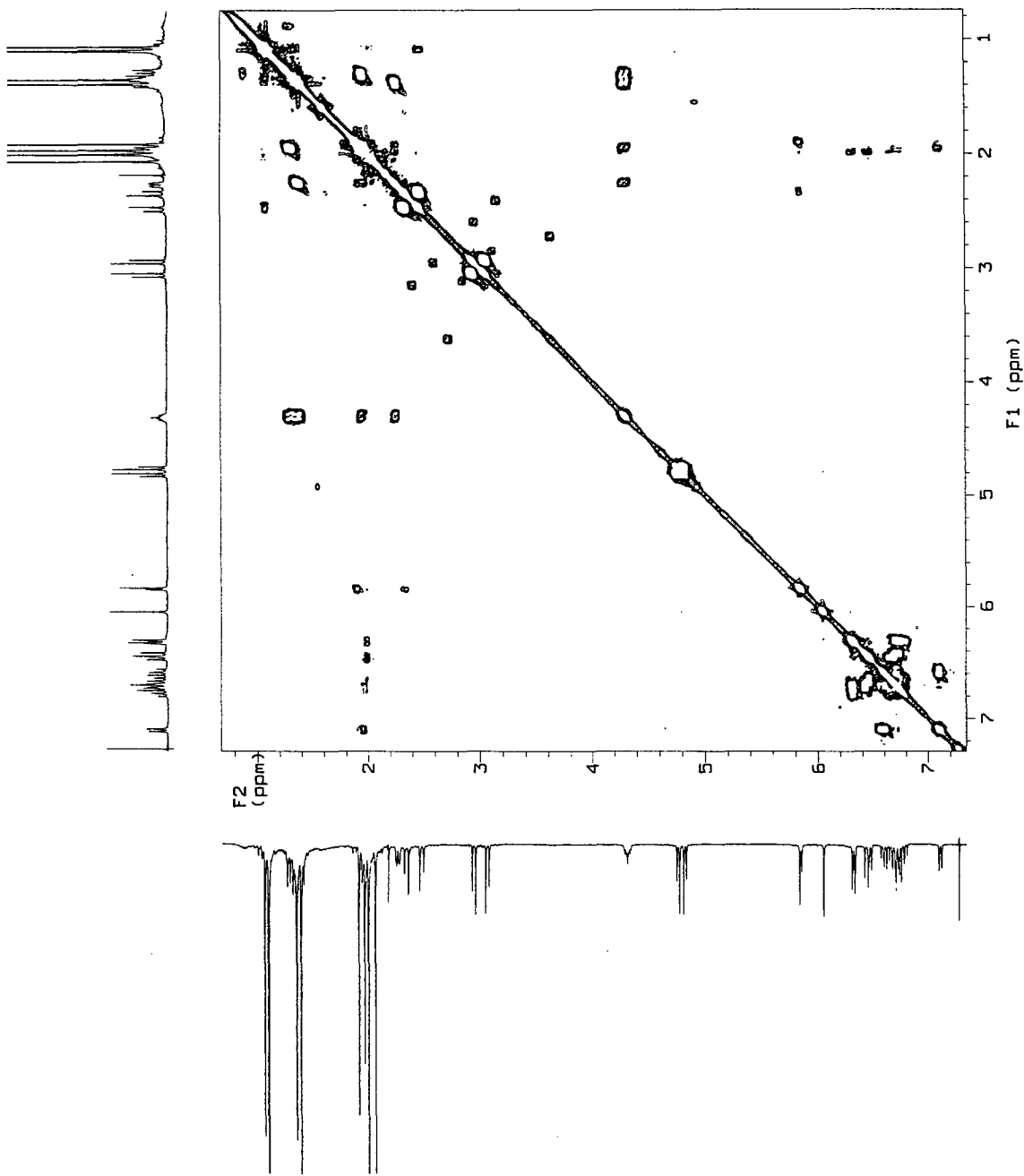


Fig. 2-13. Proton COSY spectrum of muricellaxanthin.

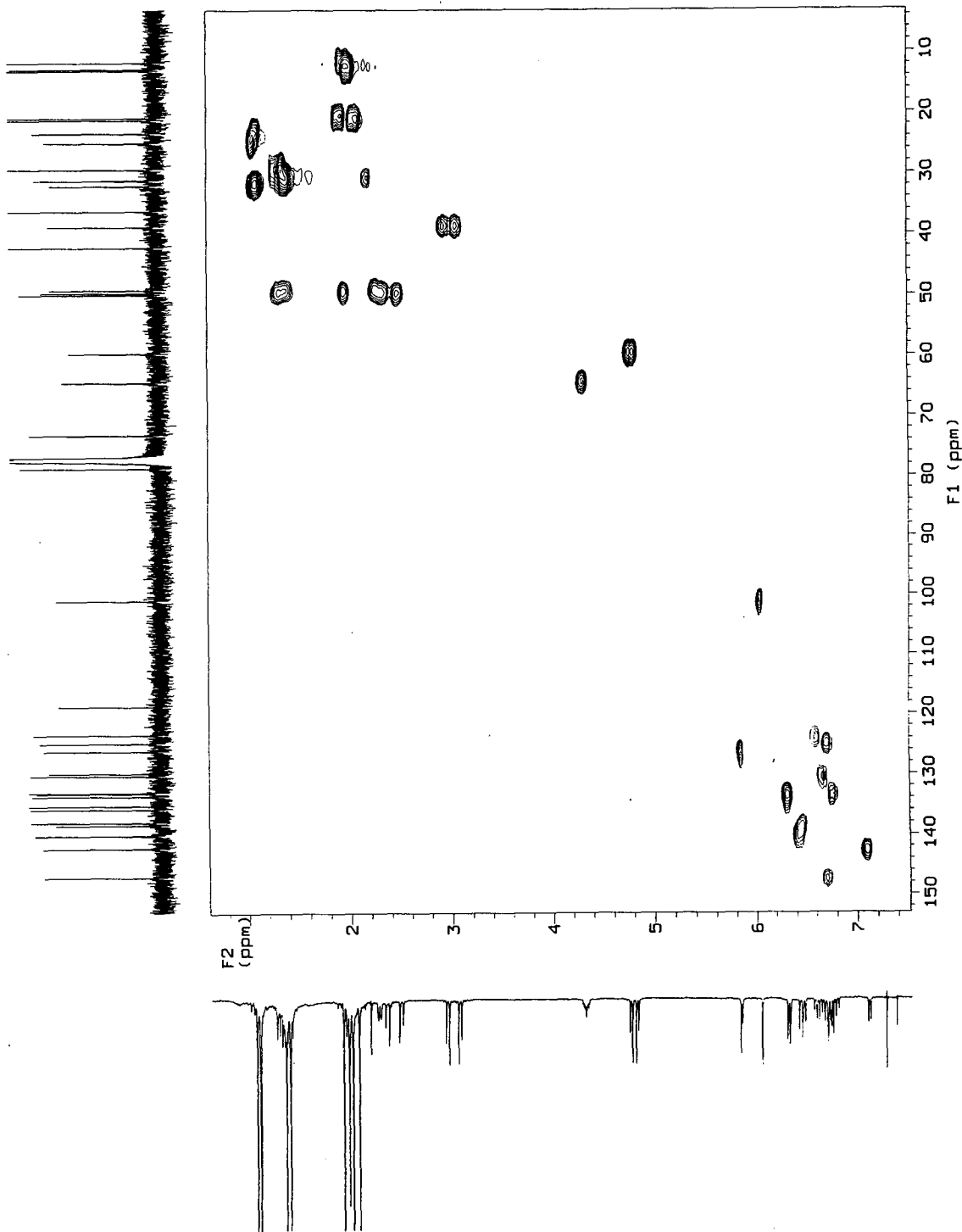


Fig. 2-14. HMQC spectrum of muricellaxanthin.

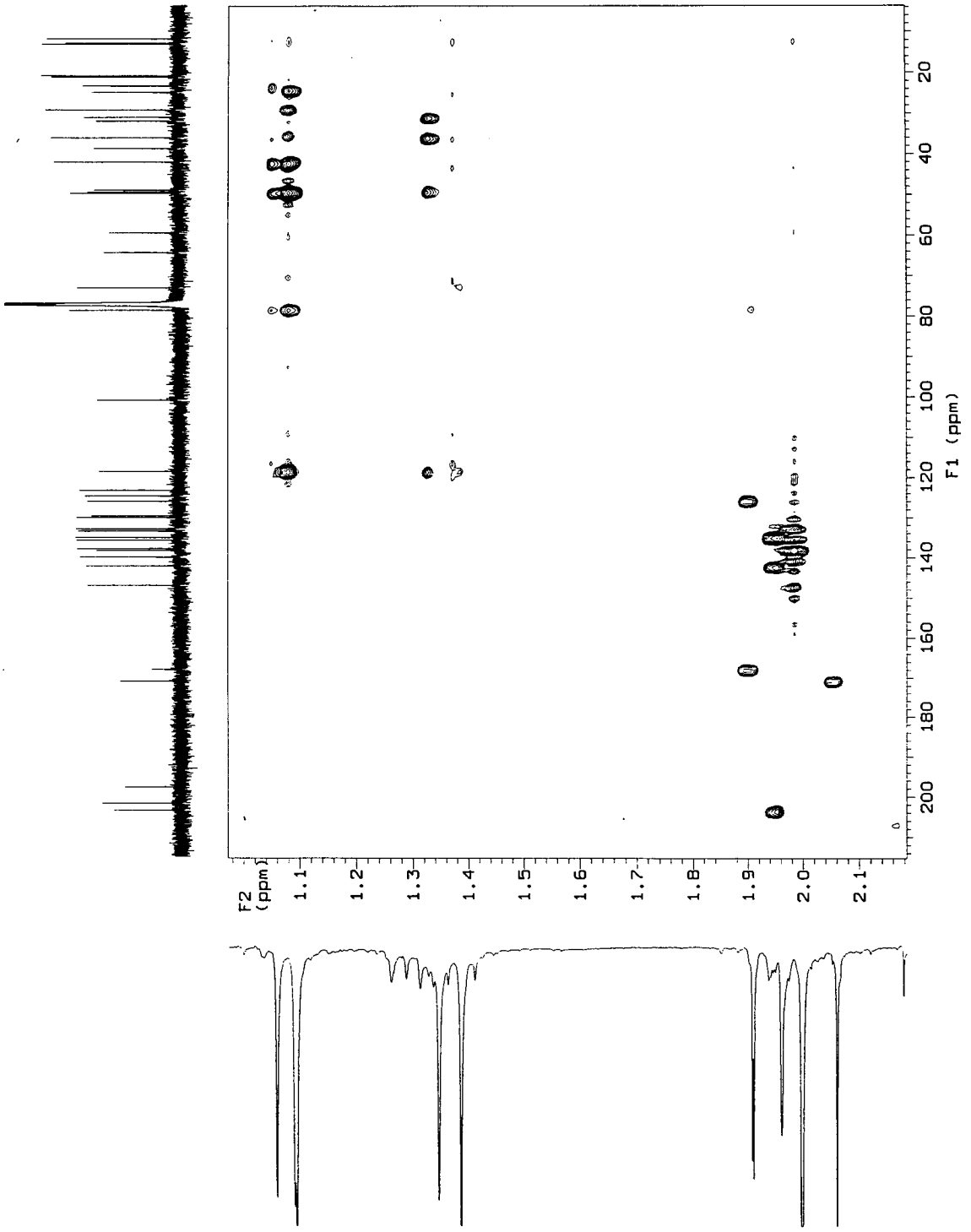


Fig. 2-15. HMBC spectrum of muricellaxanthin (upfield).

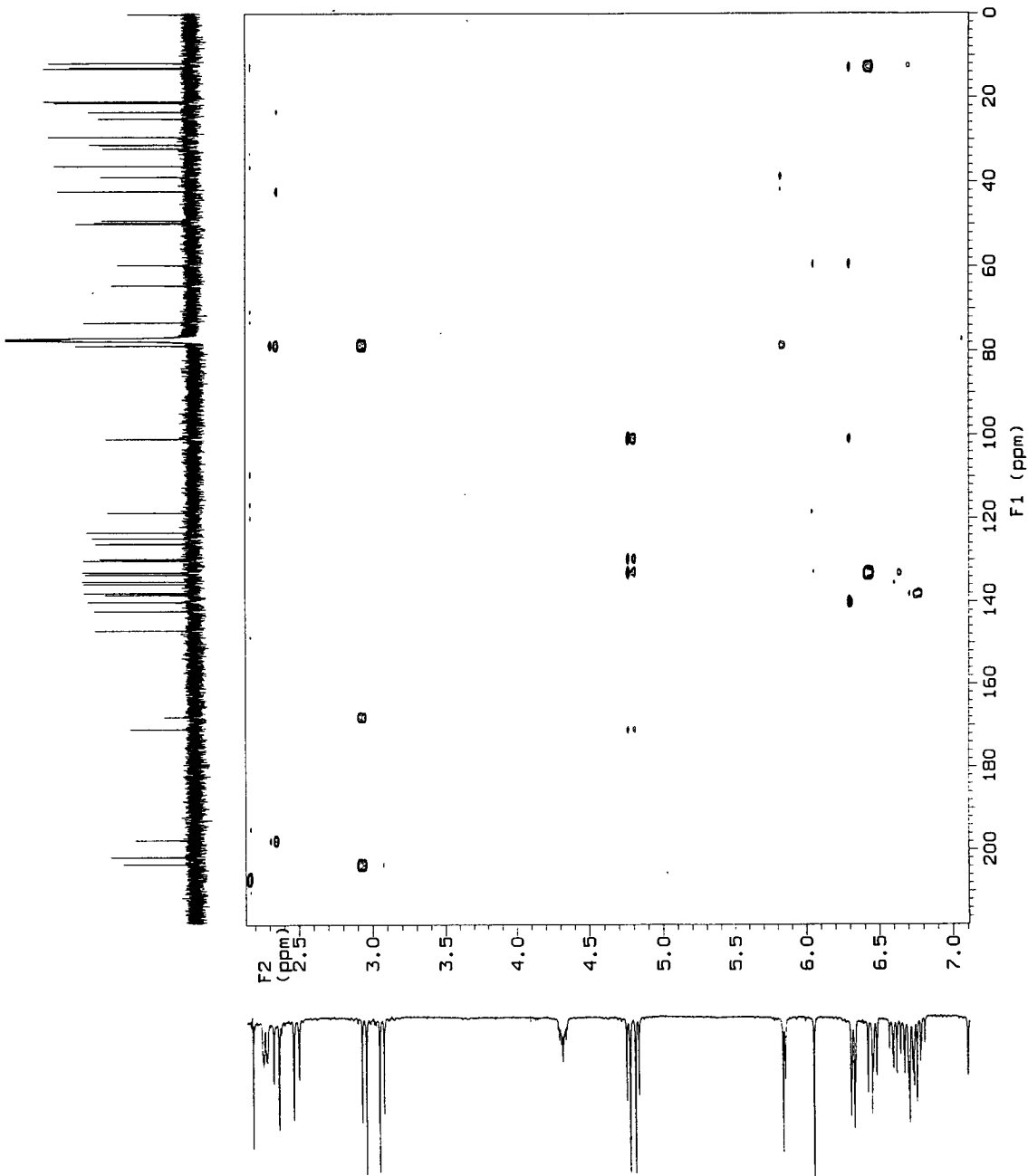


Fig. 2-16. HMBC spectrum of muricellaxanthin(downfield).

92J-18-3
Calicoferol D

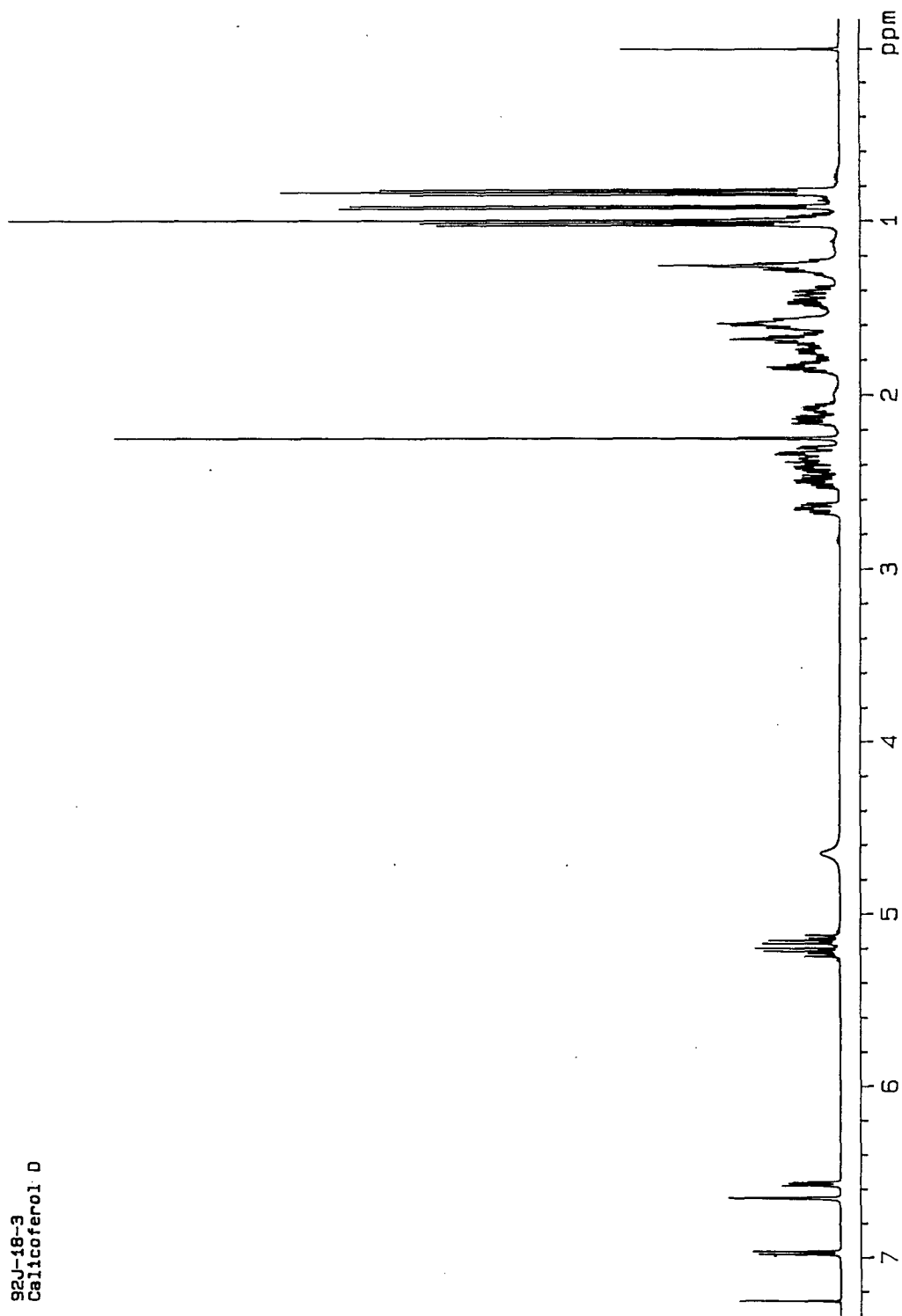


Fig. 2-17. Proton NMR spectrum of 95J-18-A.

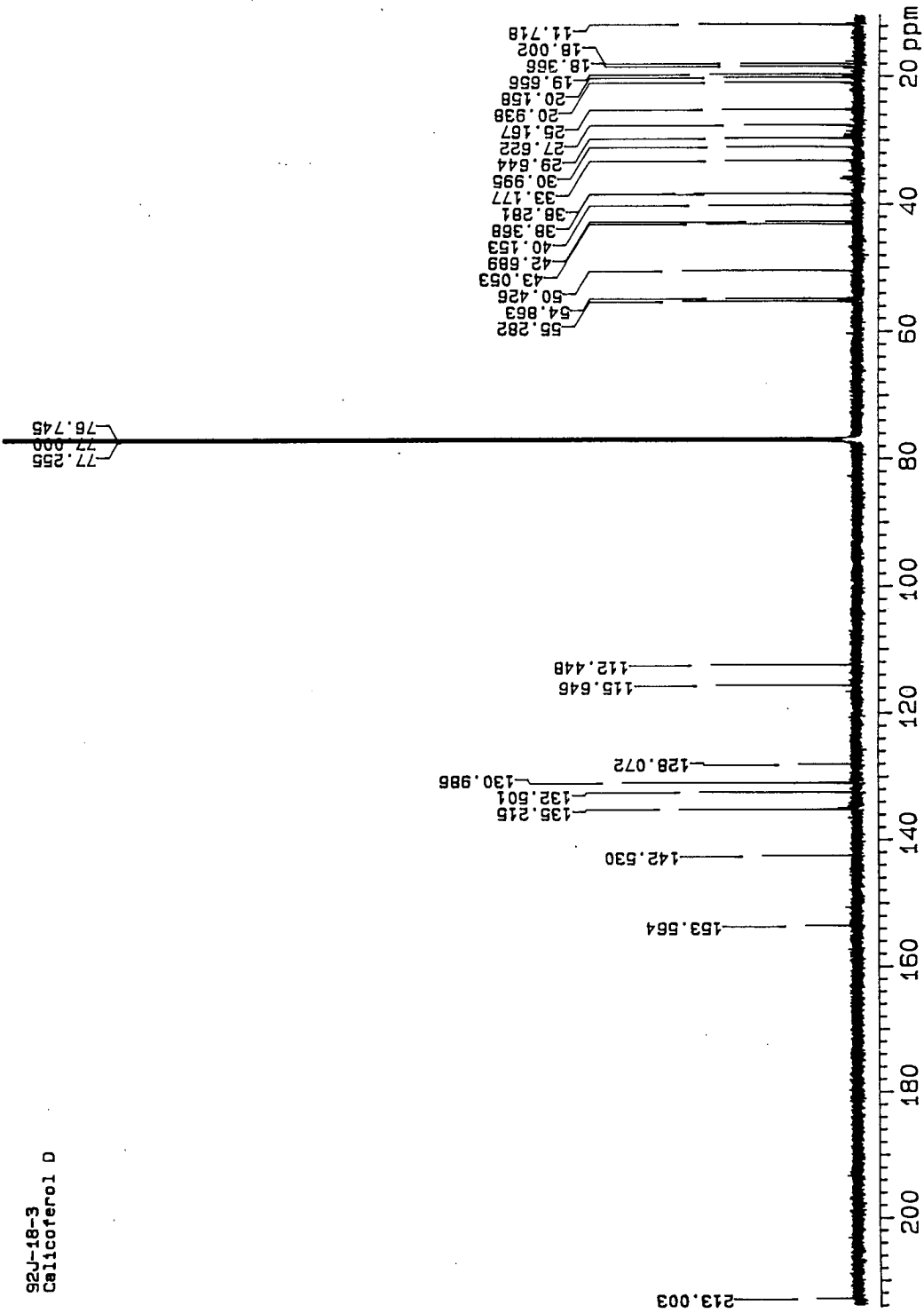


Fig. 2-18. Carbon NMR spectrum of 95J-18-A.

92J-18-4
Calliciferol E

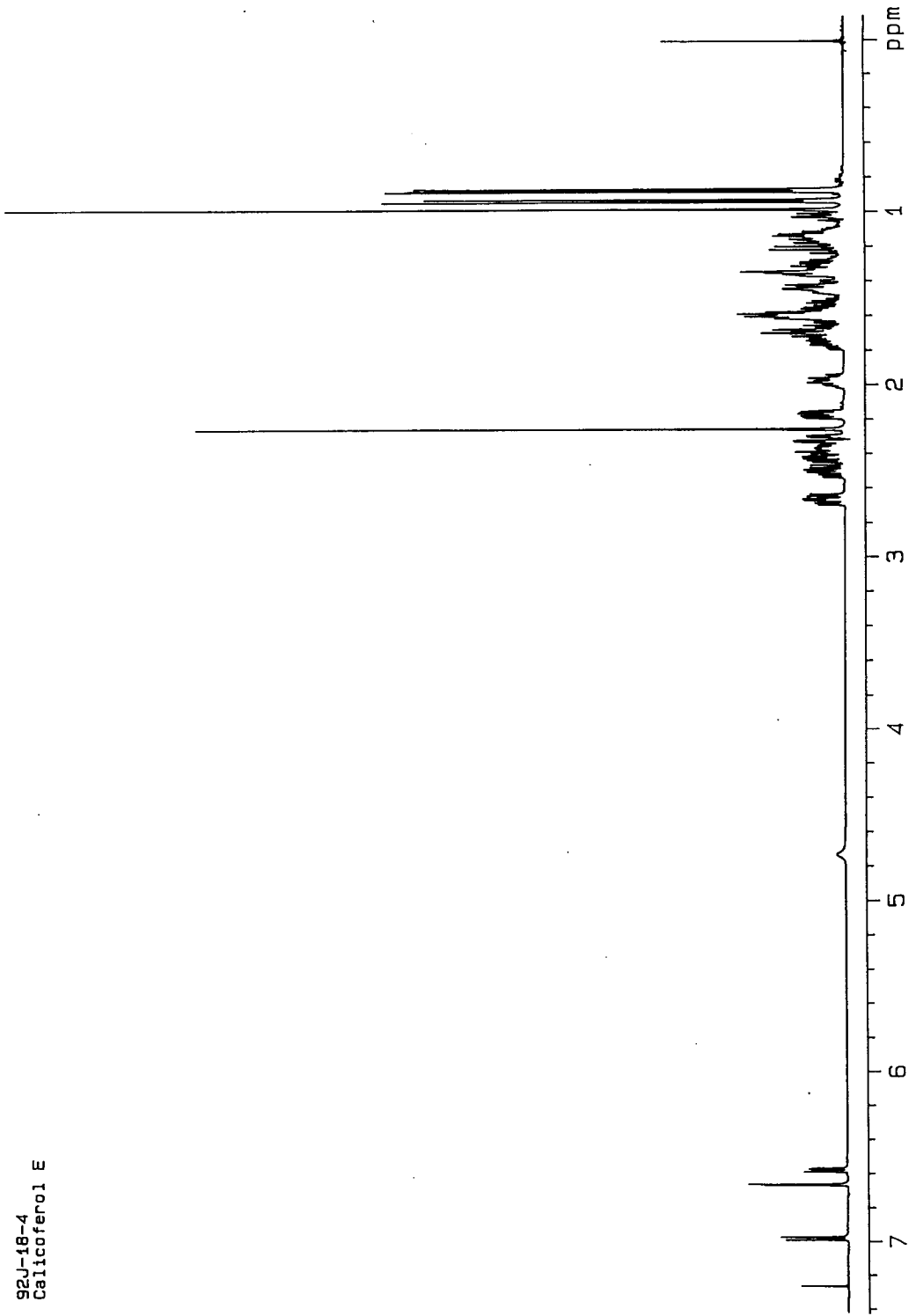


Fig. 2-19. Proton NMR spectrum of 95J-18-B.

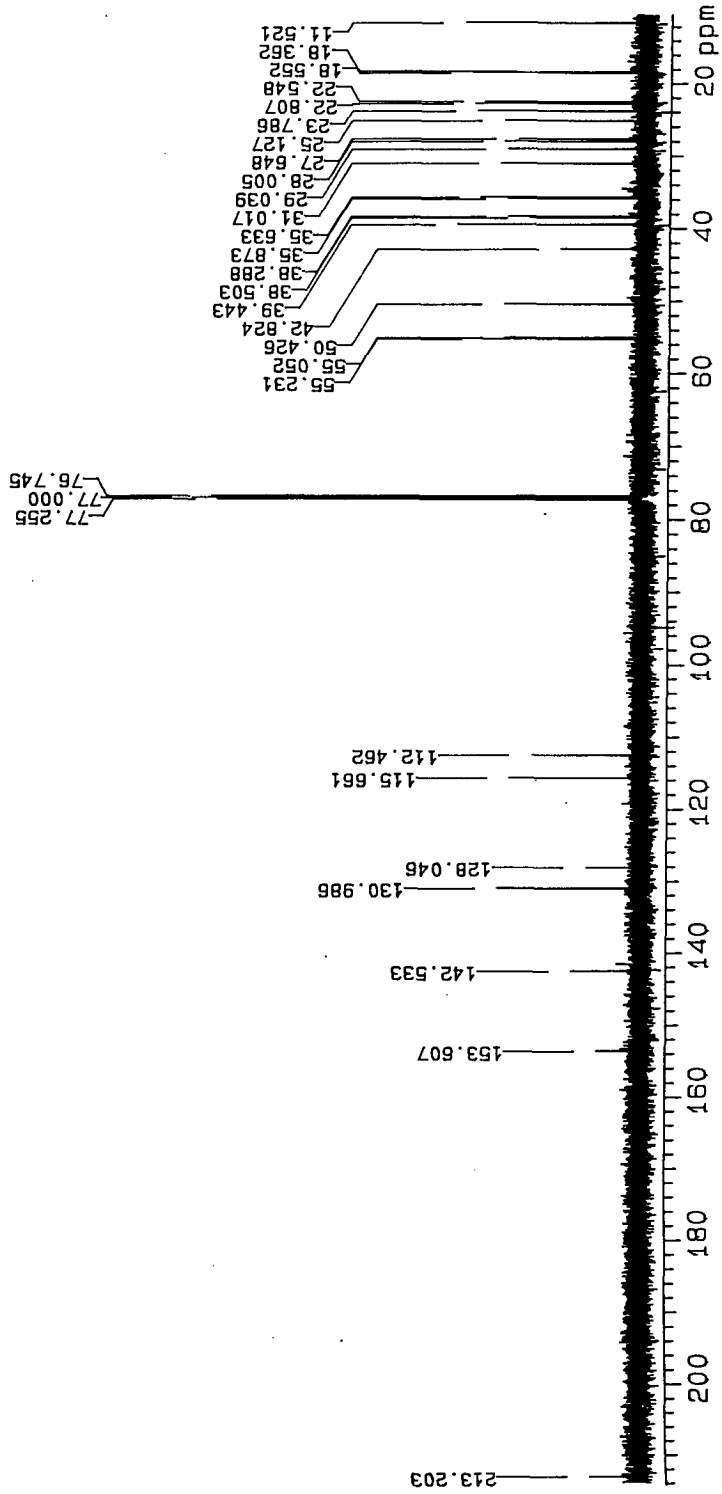


Fig. 2-20. Carbon NMR spectrum of 95J-18-B.

92J-18-J-p

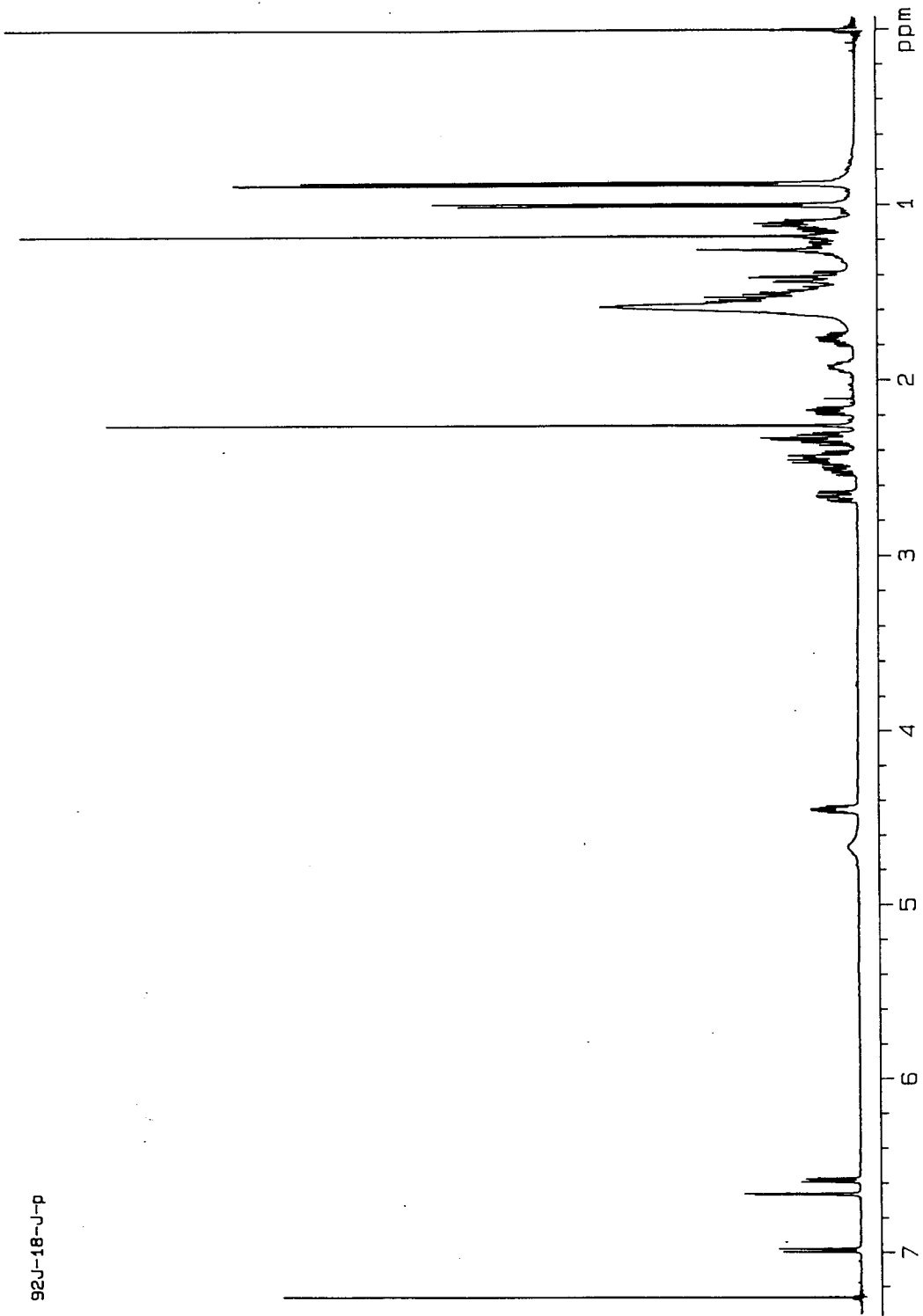


Fig. 2-21. Proton NMR spectrum of 95J-18-C.

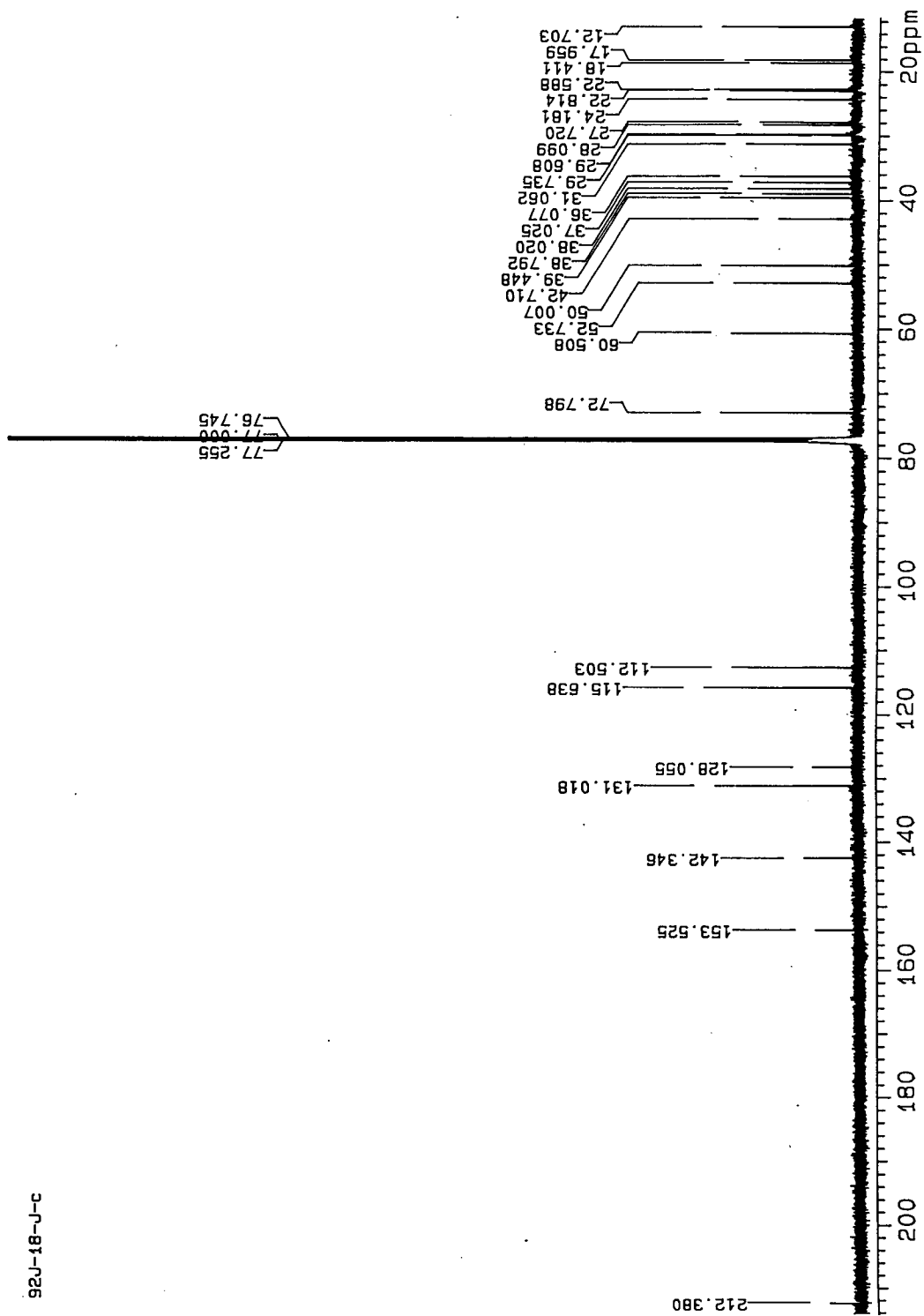


Fig. 2-22. Carbon NMR spectrum of 95J-18-C.

92J-18-J-cosy45

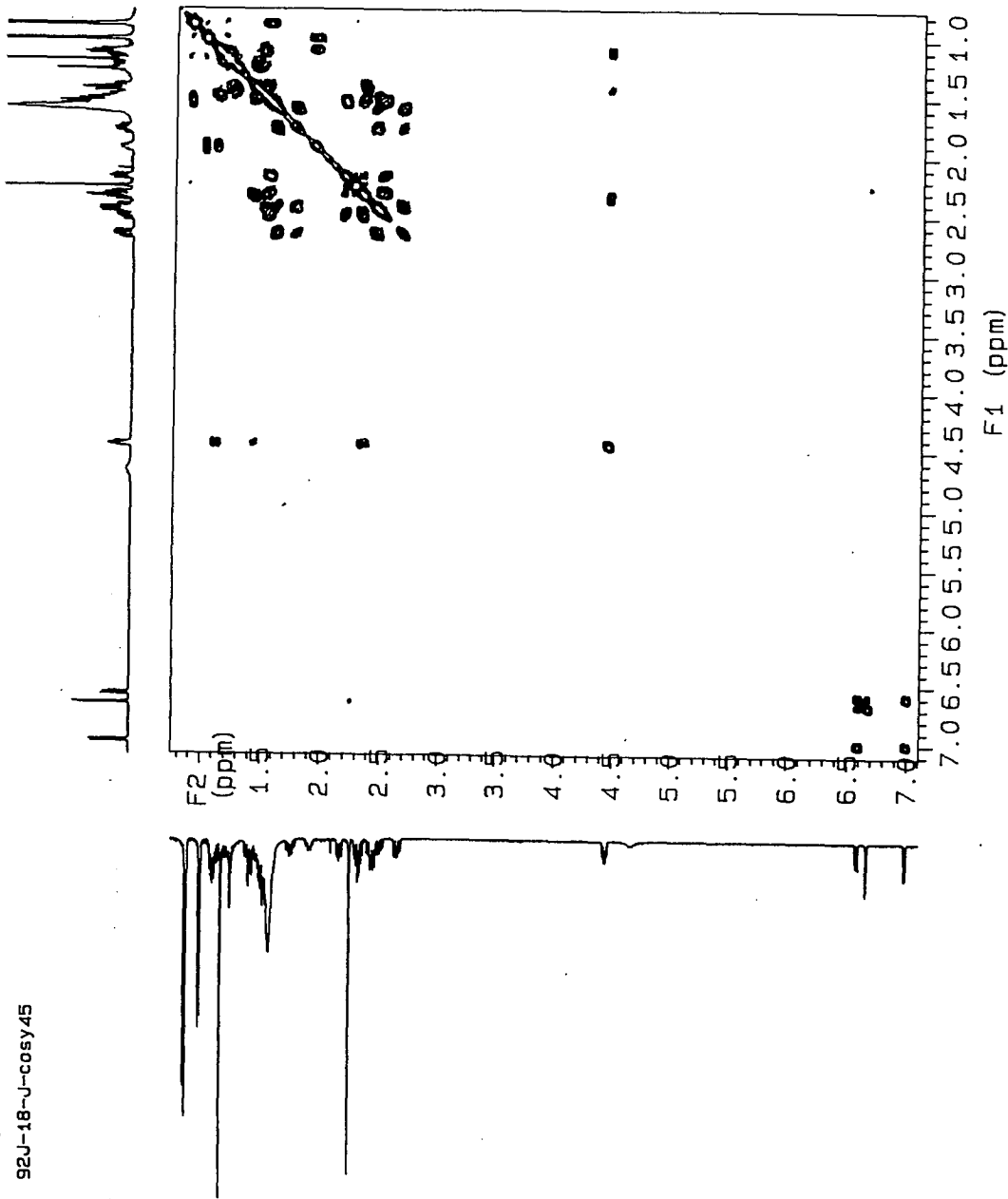


Fig. 2-23. Proton COSY spectrum of 95J-18-C.

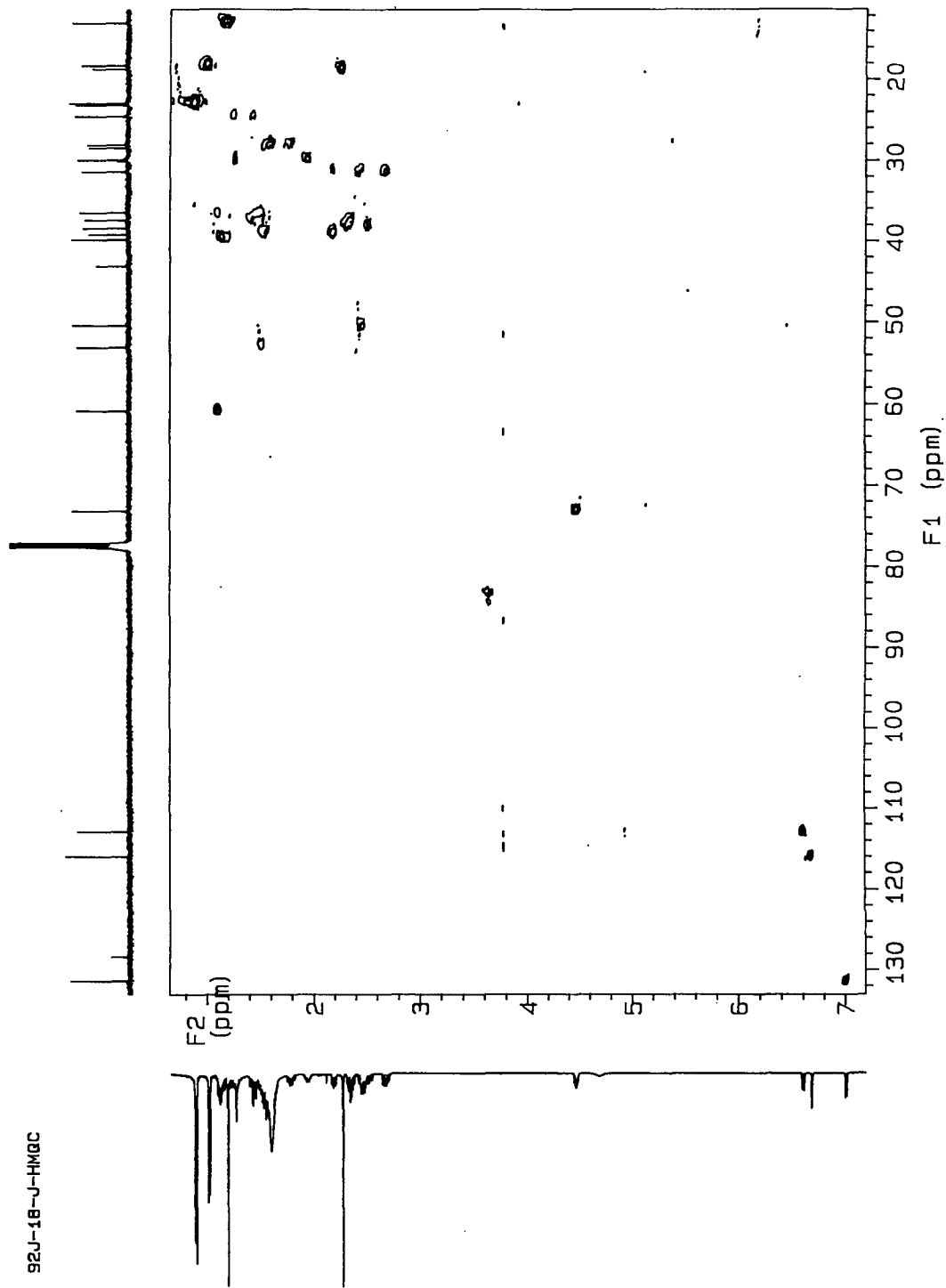


Fig. 2-24. HMQC spectrum of 95J-18-C.

92J-18-K-p

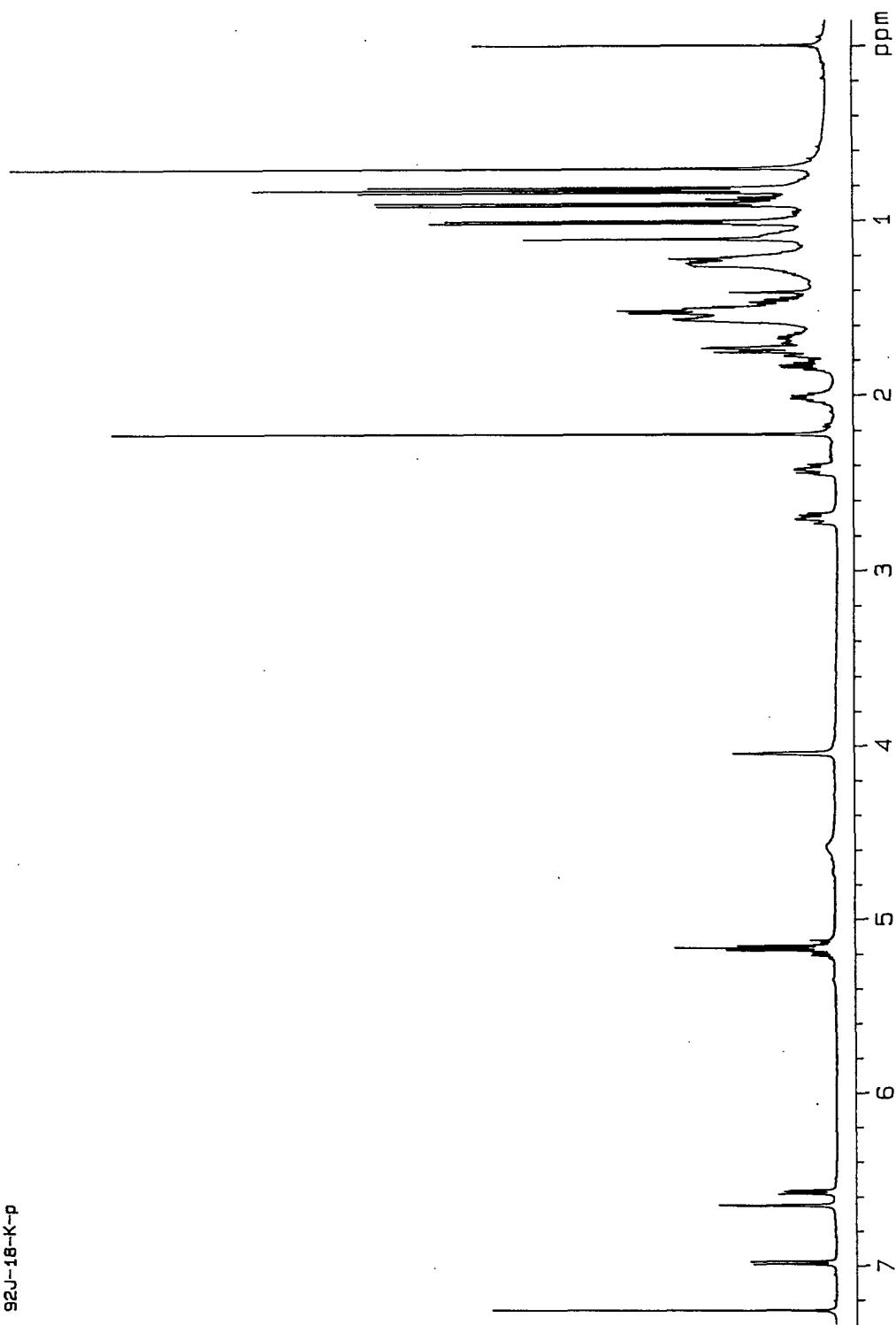


Fig. 2-25. Proton NMR spectrum of 95J-18-D.

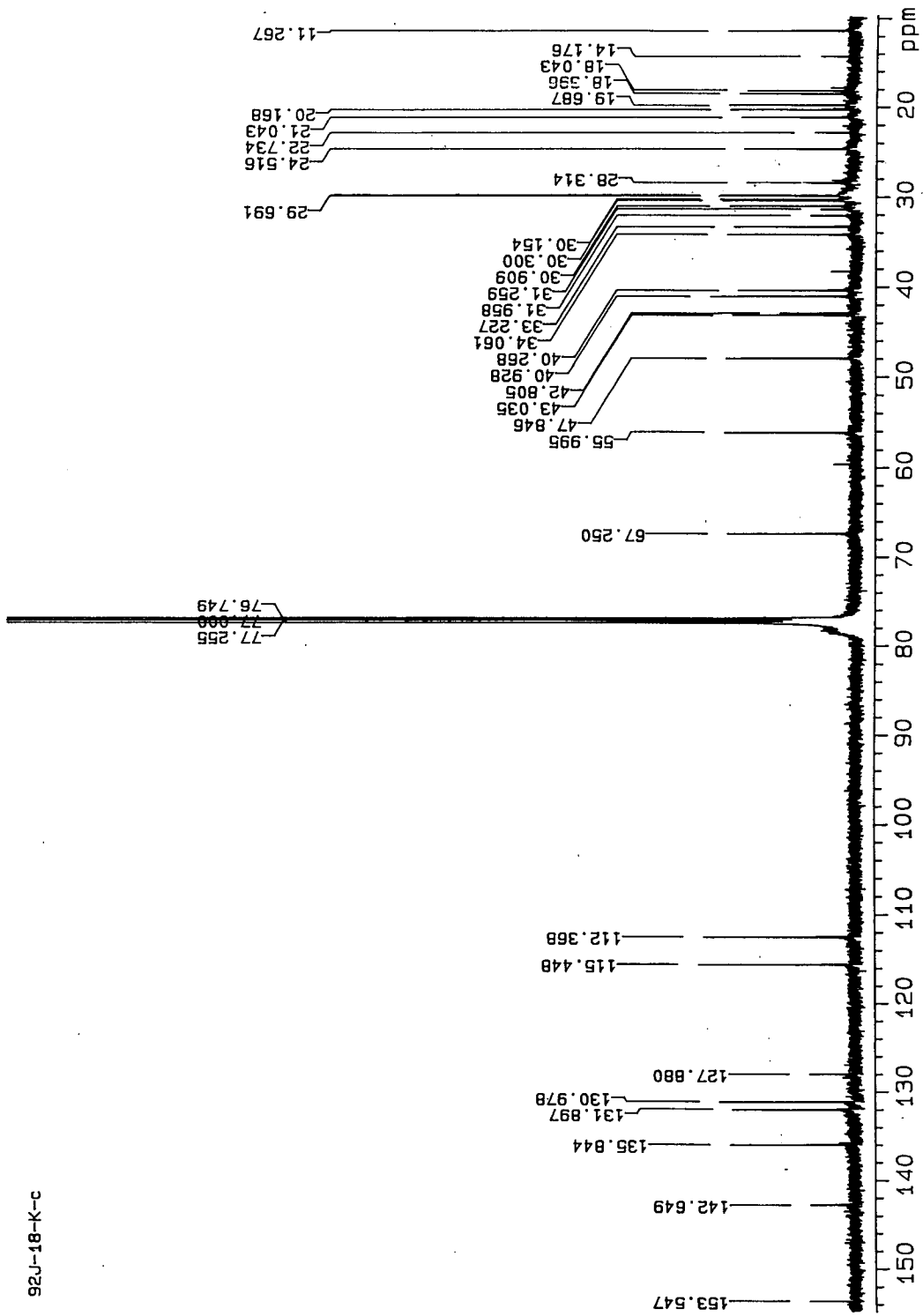


Fig. 2-26. Carbon NMR spectrum of 95J-18-D.

92J-18-K-cosy45

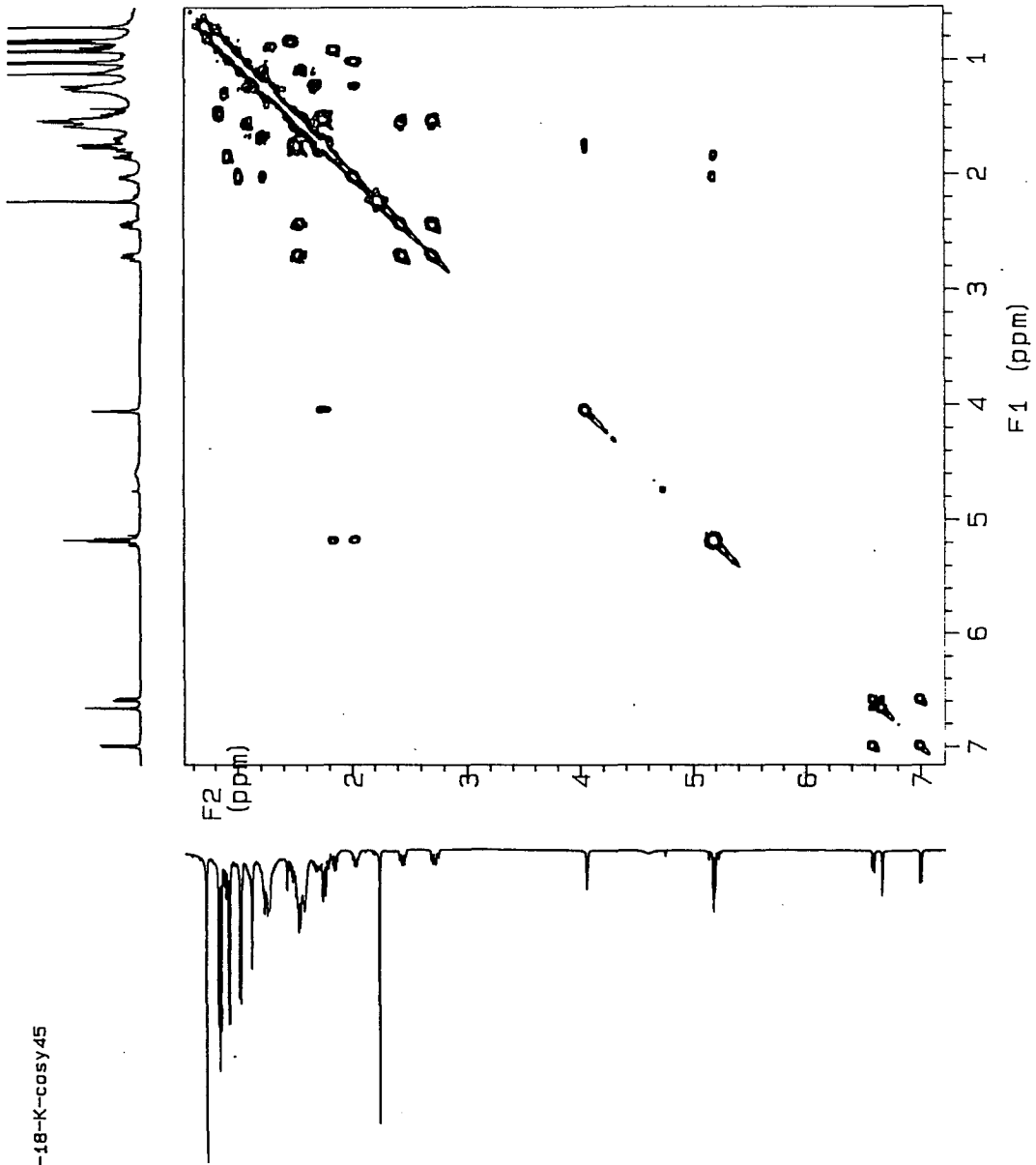


Fig. 2-27. Proton COSY spectrum of 95J-18-D.

92J-18-K-hmqc

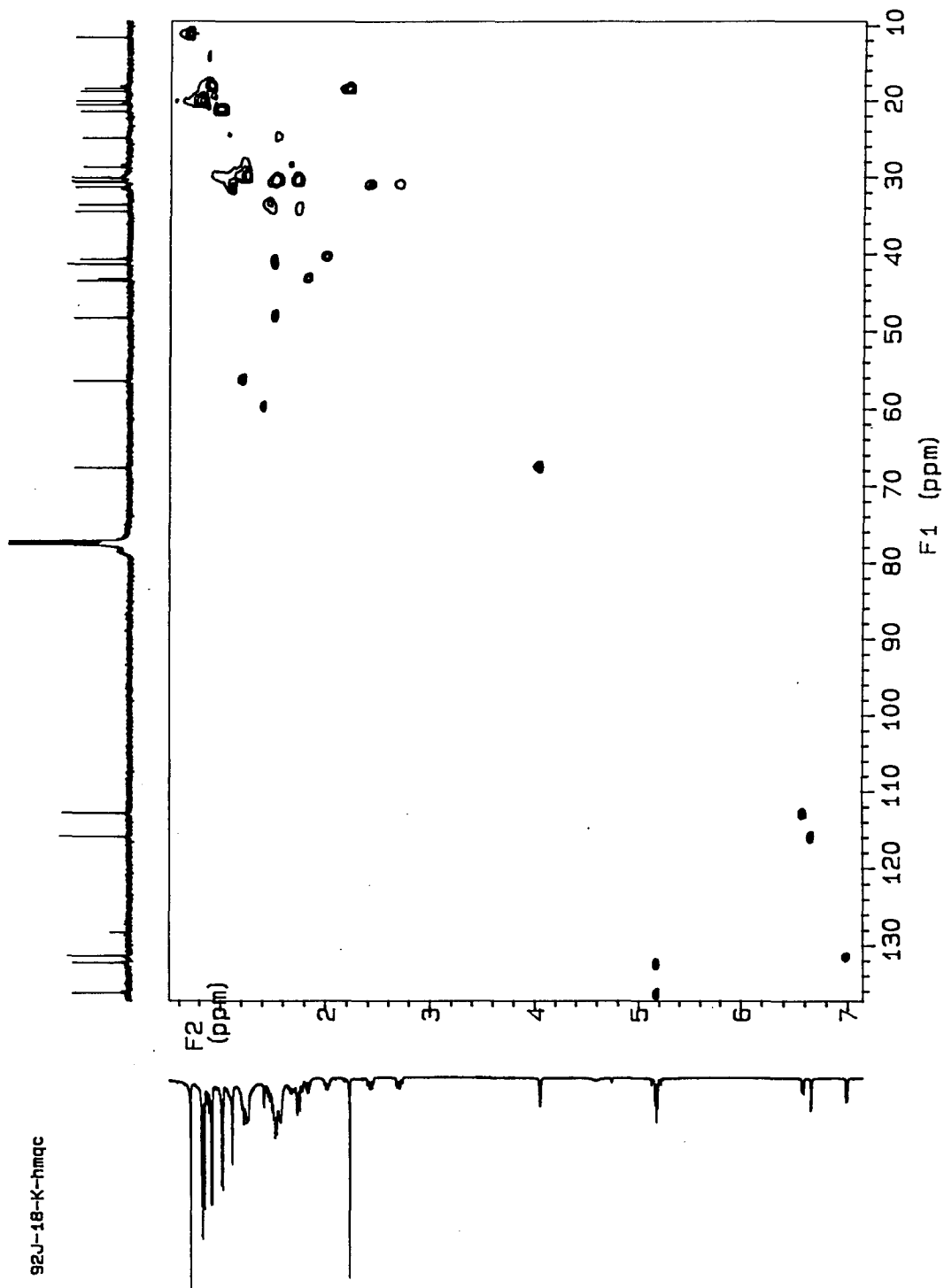


Fig. 2-28. HMQC spectrum of 95J-18-D.

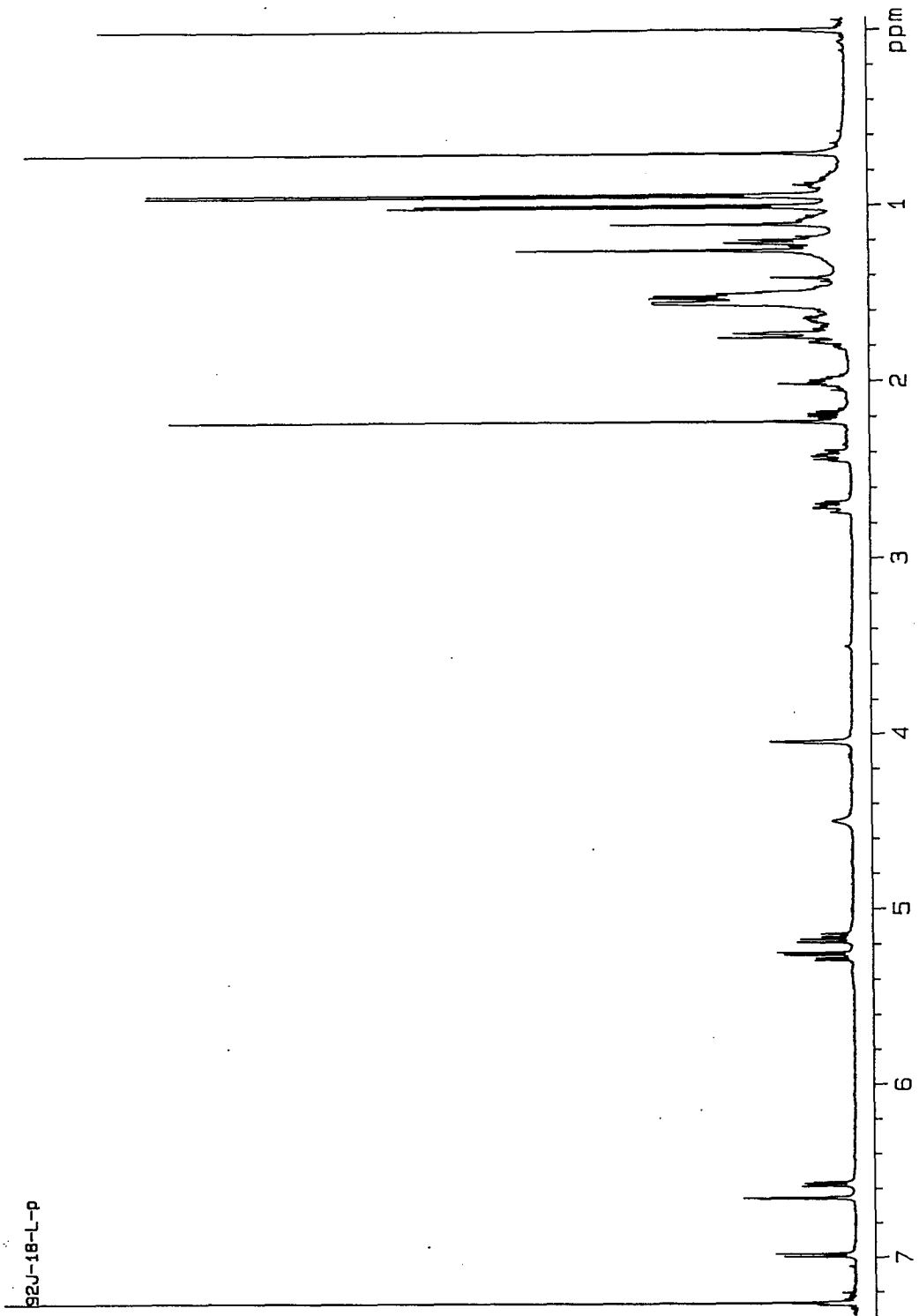


Fig. 2-29. Proton NMR spectrum of 95J-18-E.

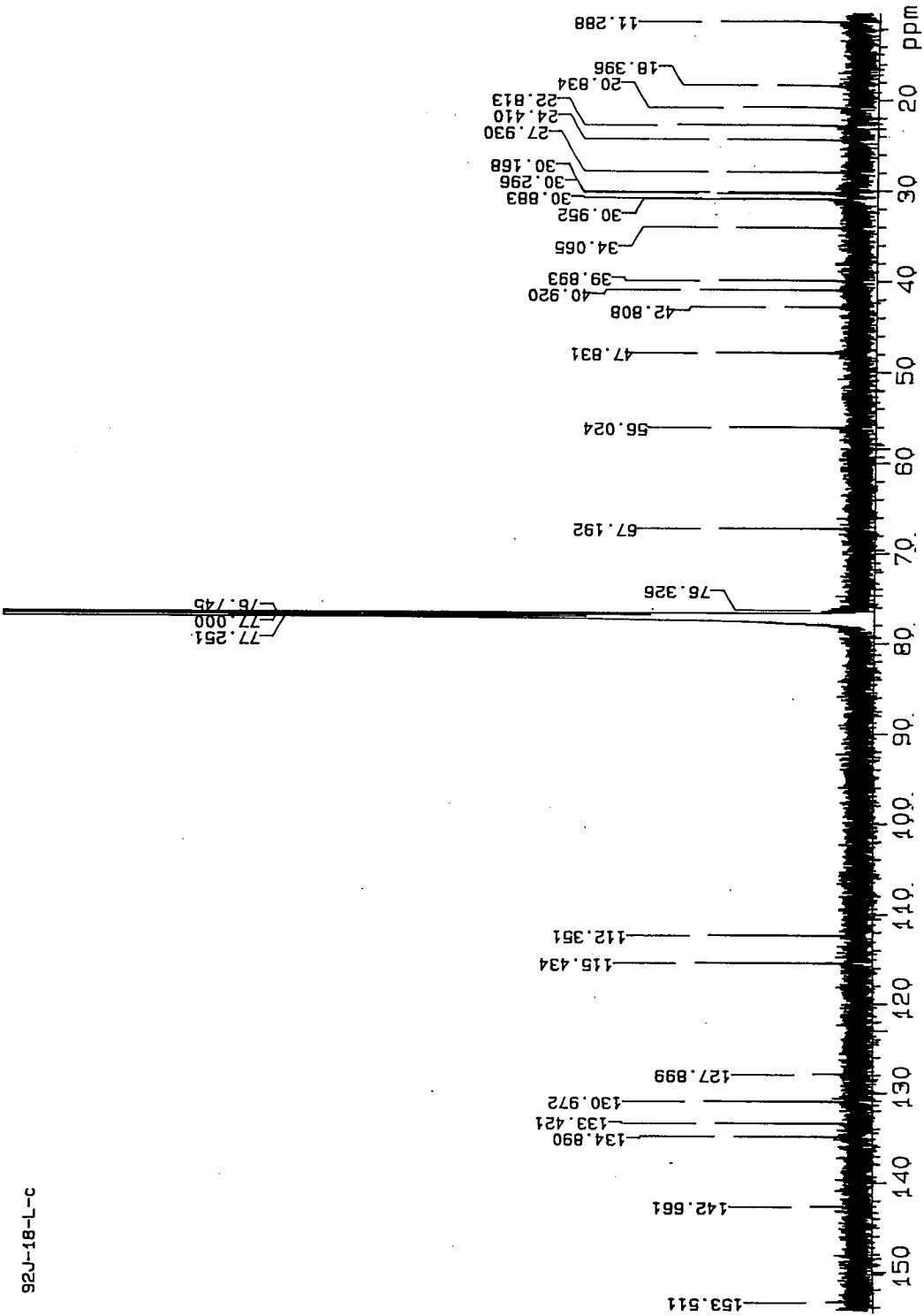


Fig. 2-30. Carbon NMR spectrum of 95J-18-E.

92J-18-L-cosy 45

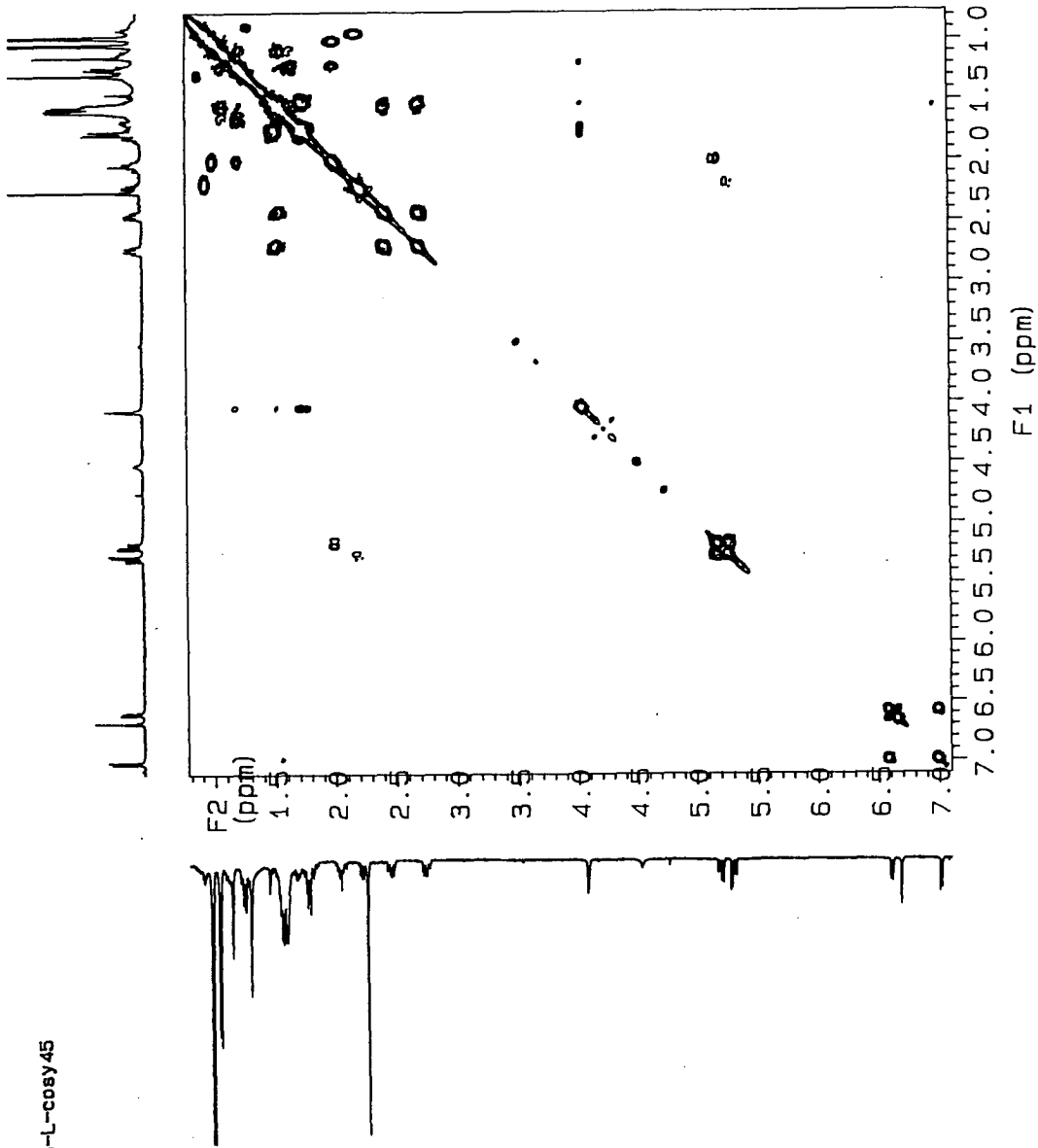


Fig. 2-31. Proton COSY spectrum of 95J-18-E.

92J-18-L-hmqc

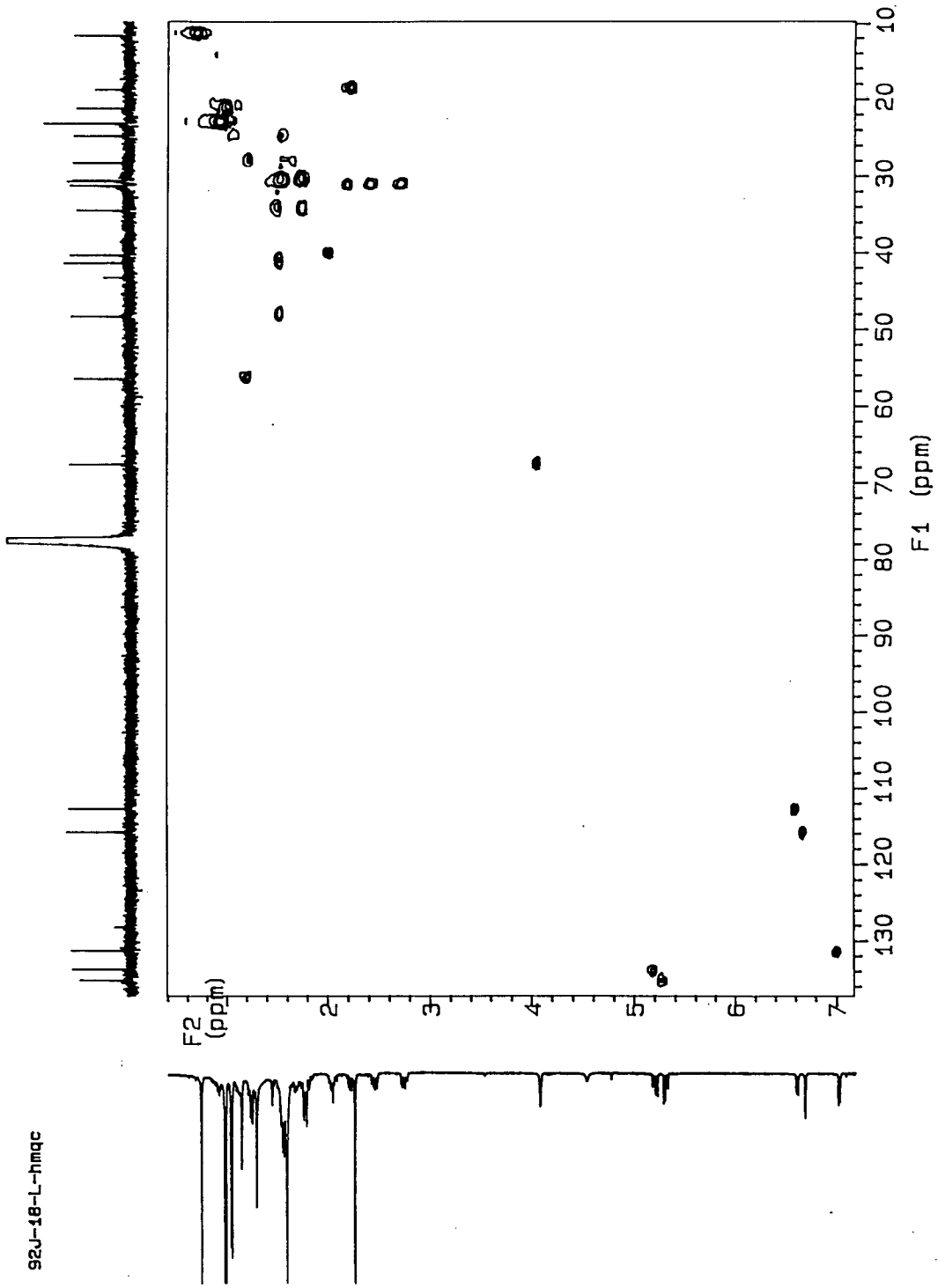


Fig. 2-32. HMQC spectrum of 95J-18-E.

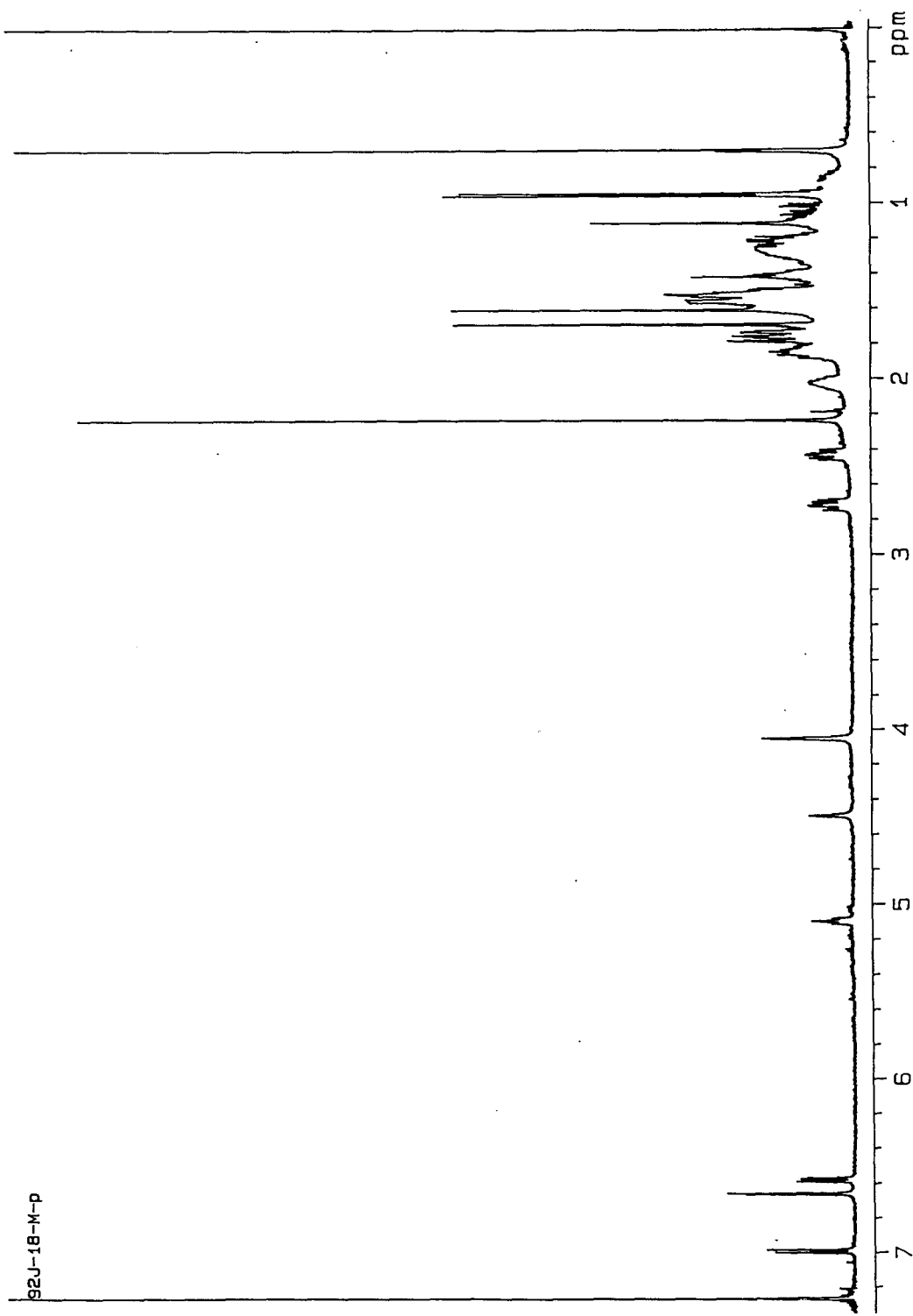


Fig. 2-33. Proton NMR spectrum of 95J-18-F.

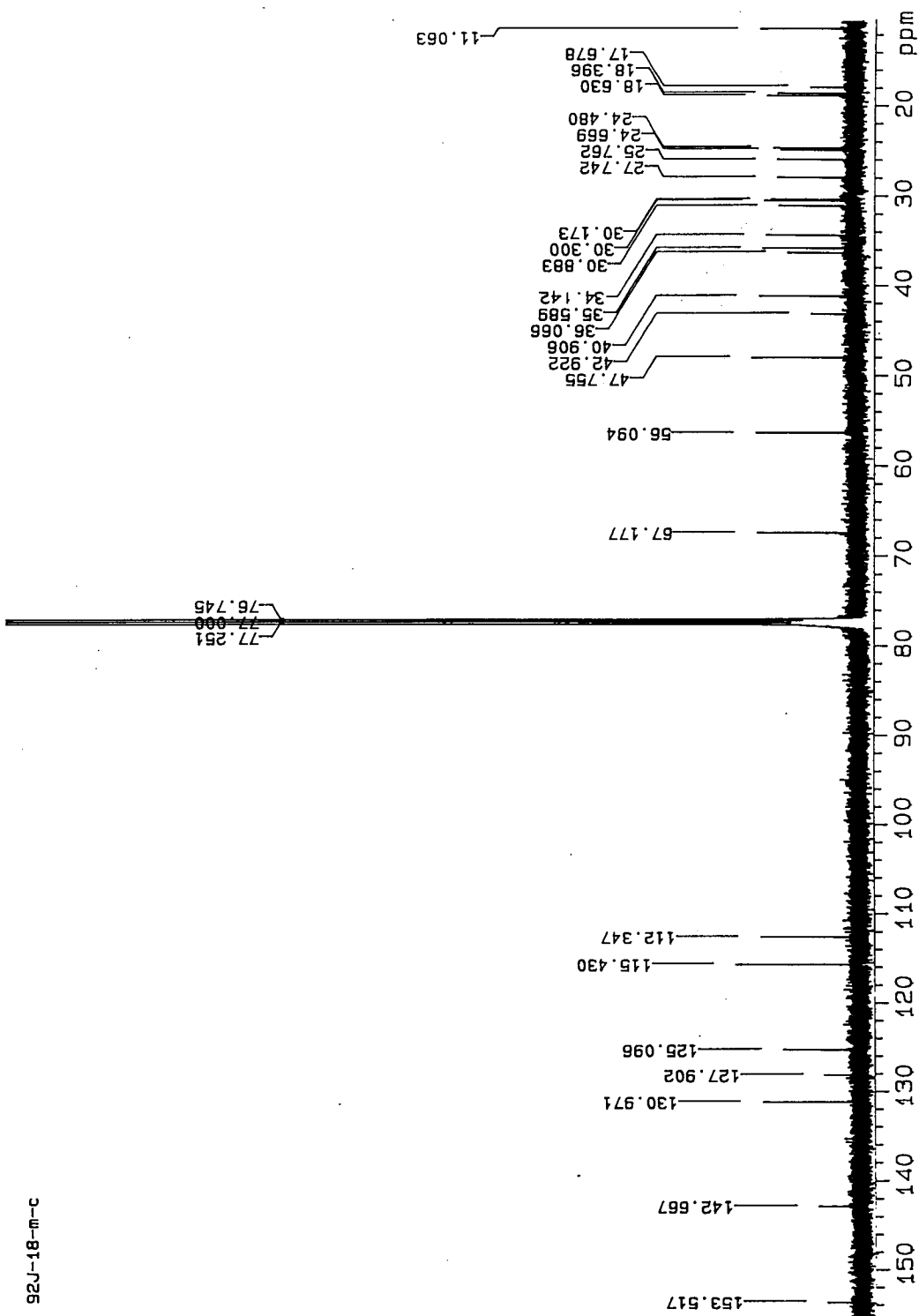


Fig. 2-34. Carbon NMR spectrum of 95J-18-F.

92J-18-M-cosy45

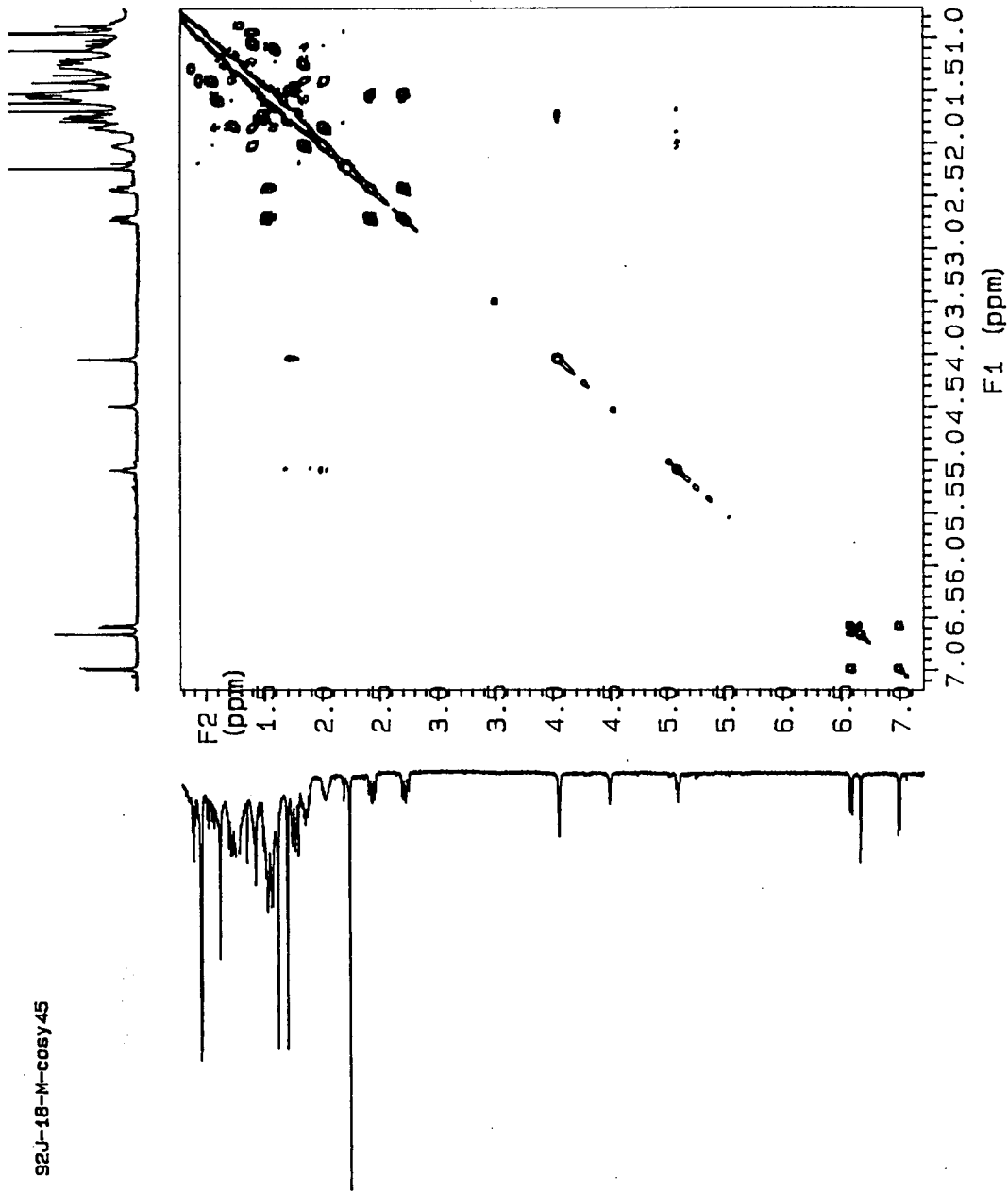


Fig. 2-35. Proton COSY spectrum of 95J-18-F.

92J-18-H-hmqc

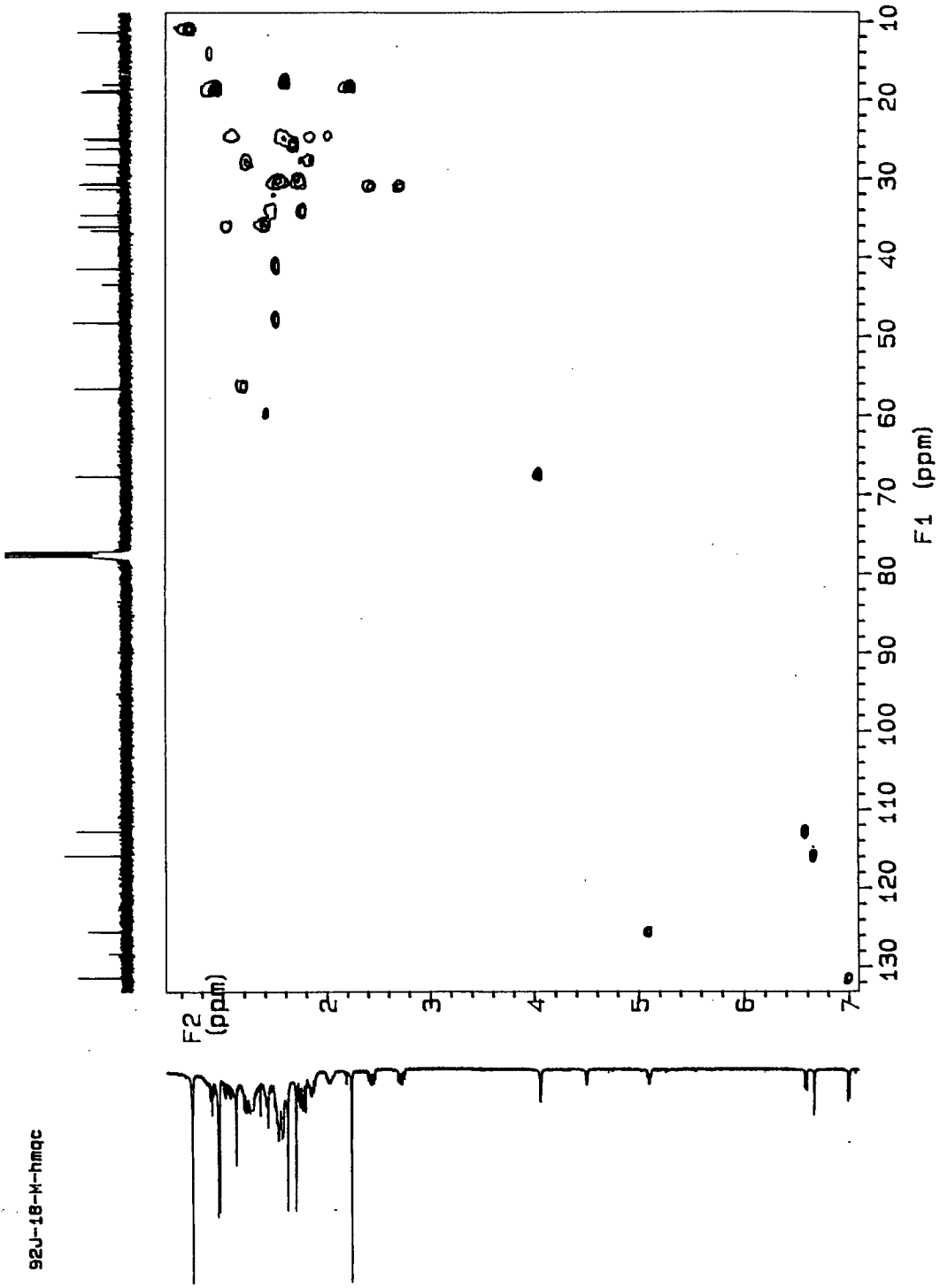


Fig. 2-36. HMQC spectrum of 95J-18-F.

91K-1-nfc-45%Et-np16-pp5-p

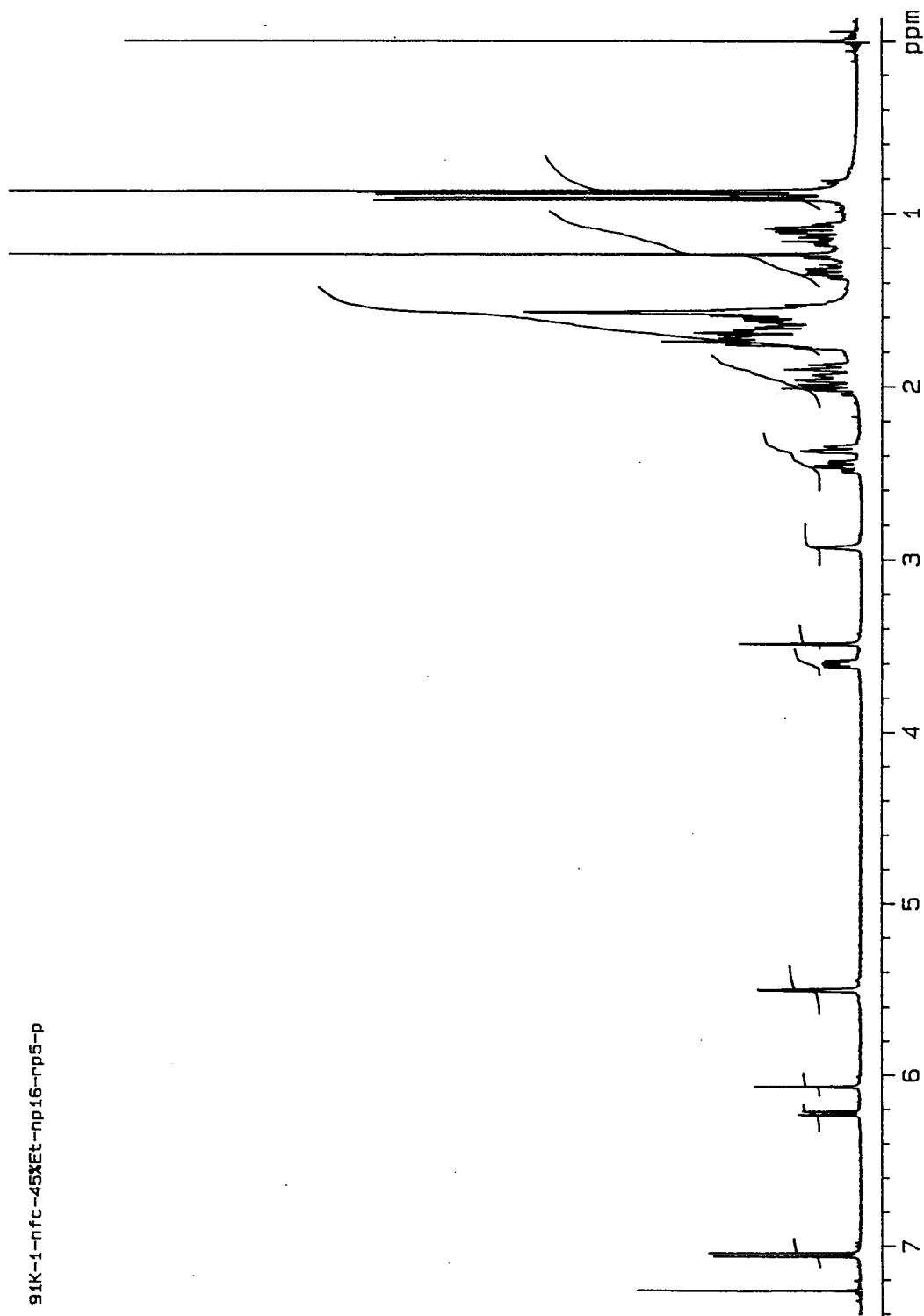


Fig. 2-37. Proton NMR spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

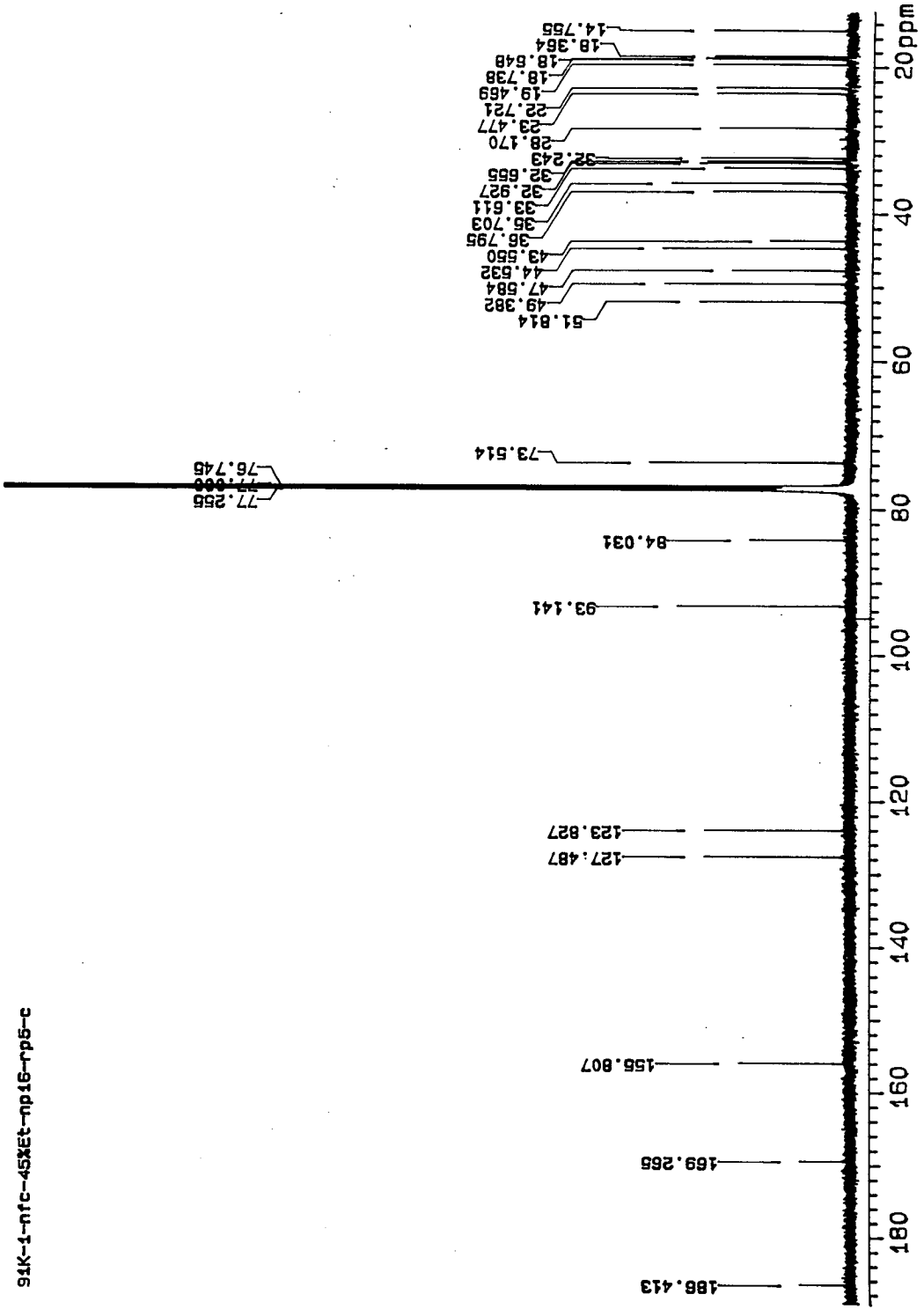


Fig. 2-38. Carbon NMR spectrum of anatosomacetal A(91K-1-A).

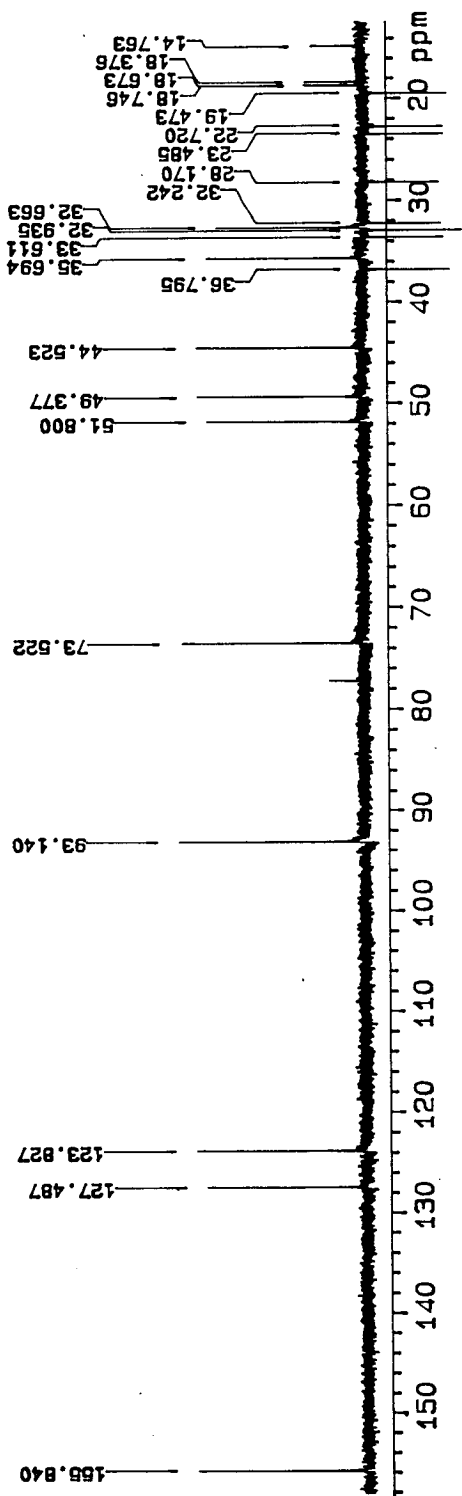


Fig. 2-39. DEPT spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

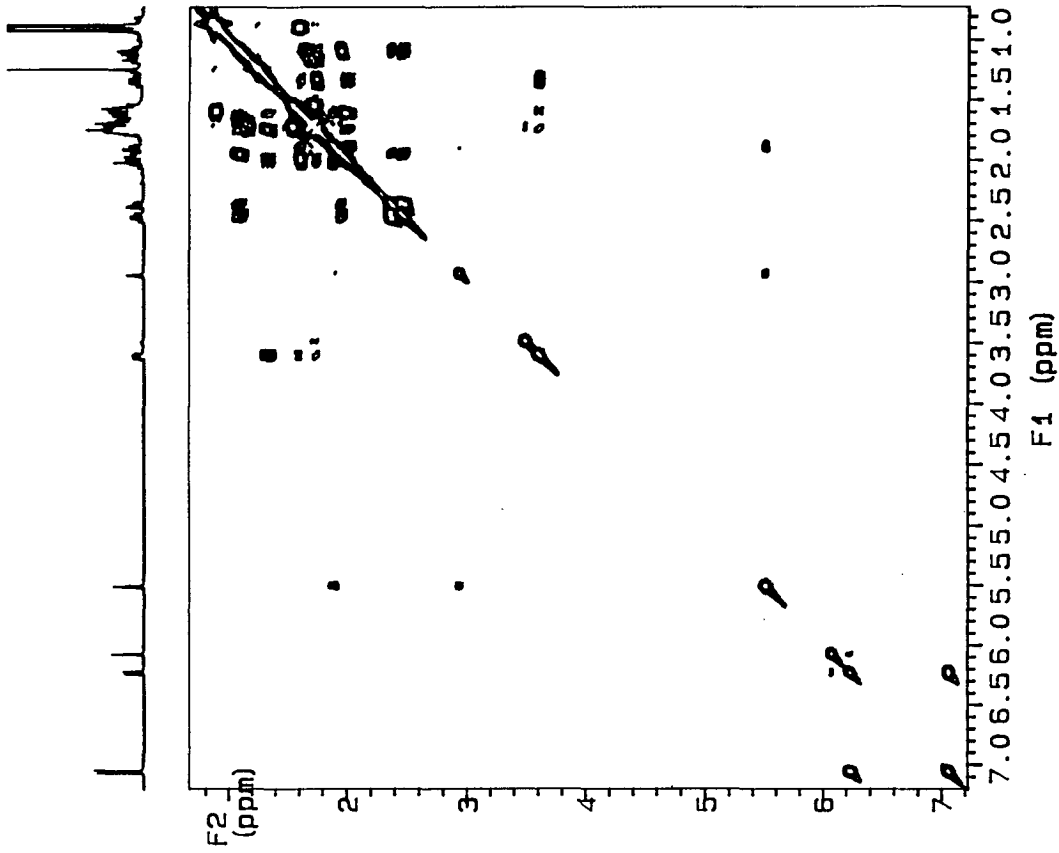


Fig. 2-40. Proton COSY spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

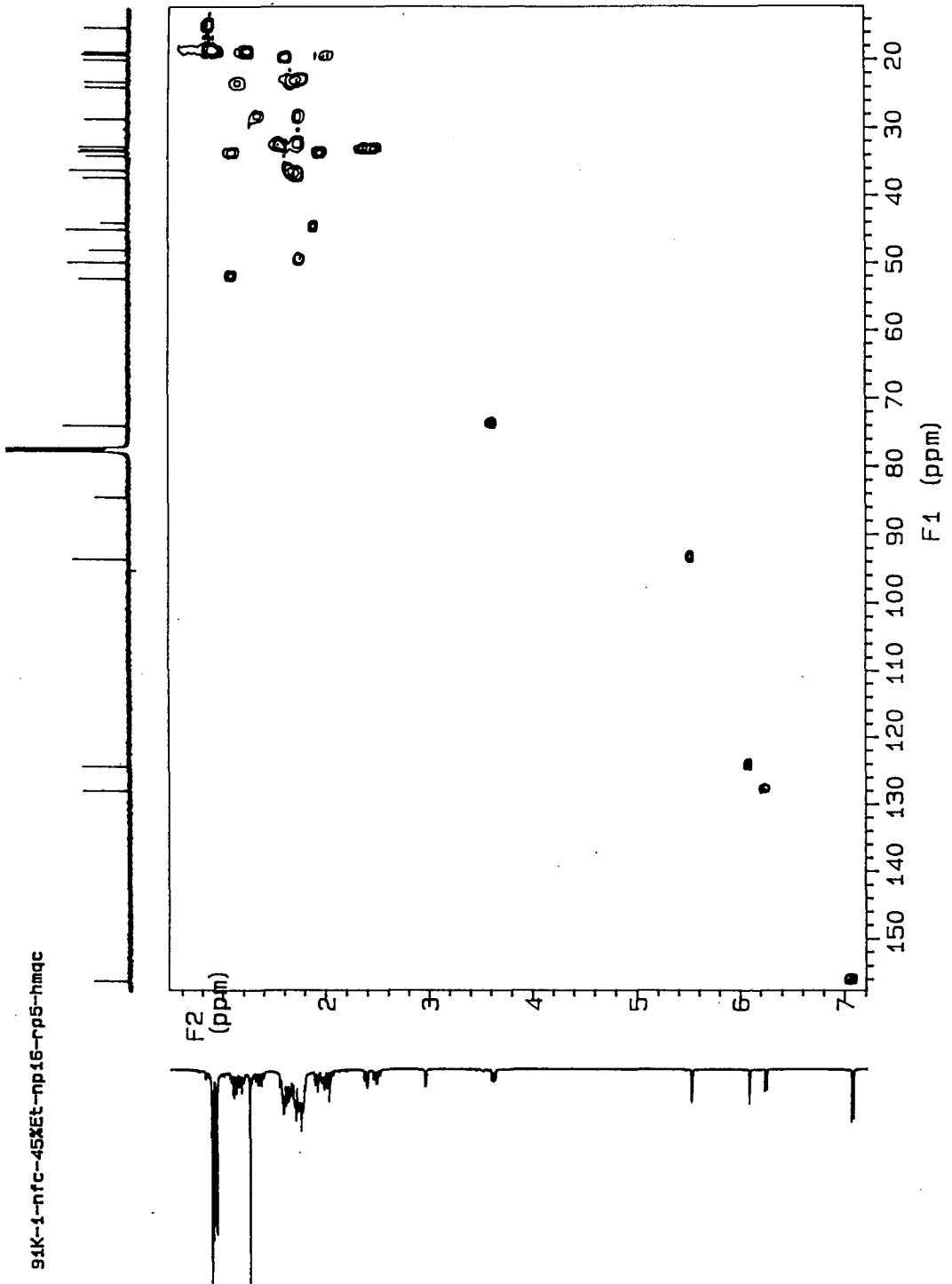


Fig. 2-41. HMQC spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

91K-1-nfc-45XEt-np16-rp5-hmbc
J=8 Hz

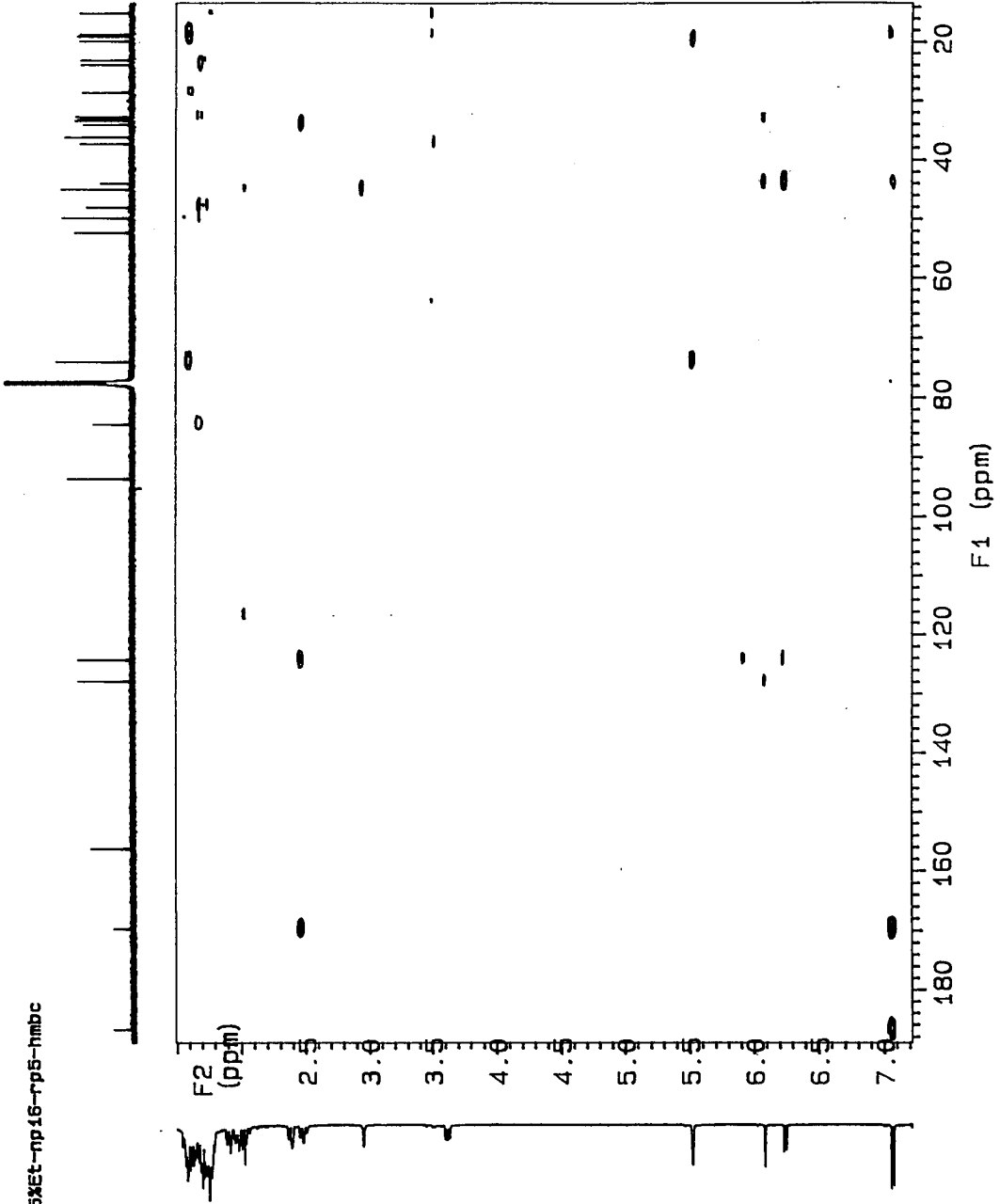


Fig. 2-42. HMBC spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

91K-1-nfc-45xet-np16-rp5-noesy

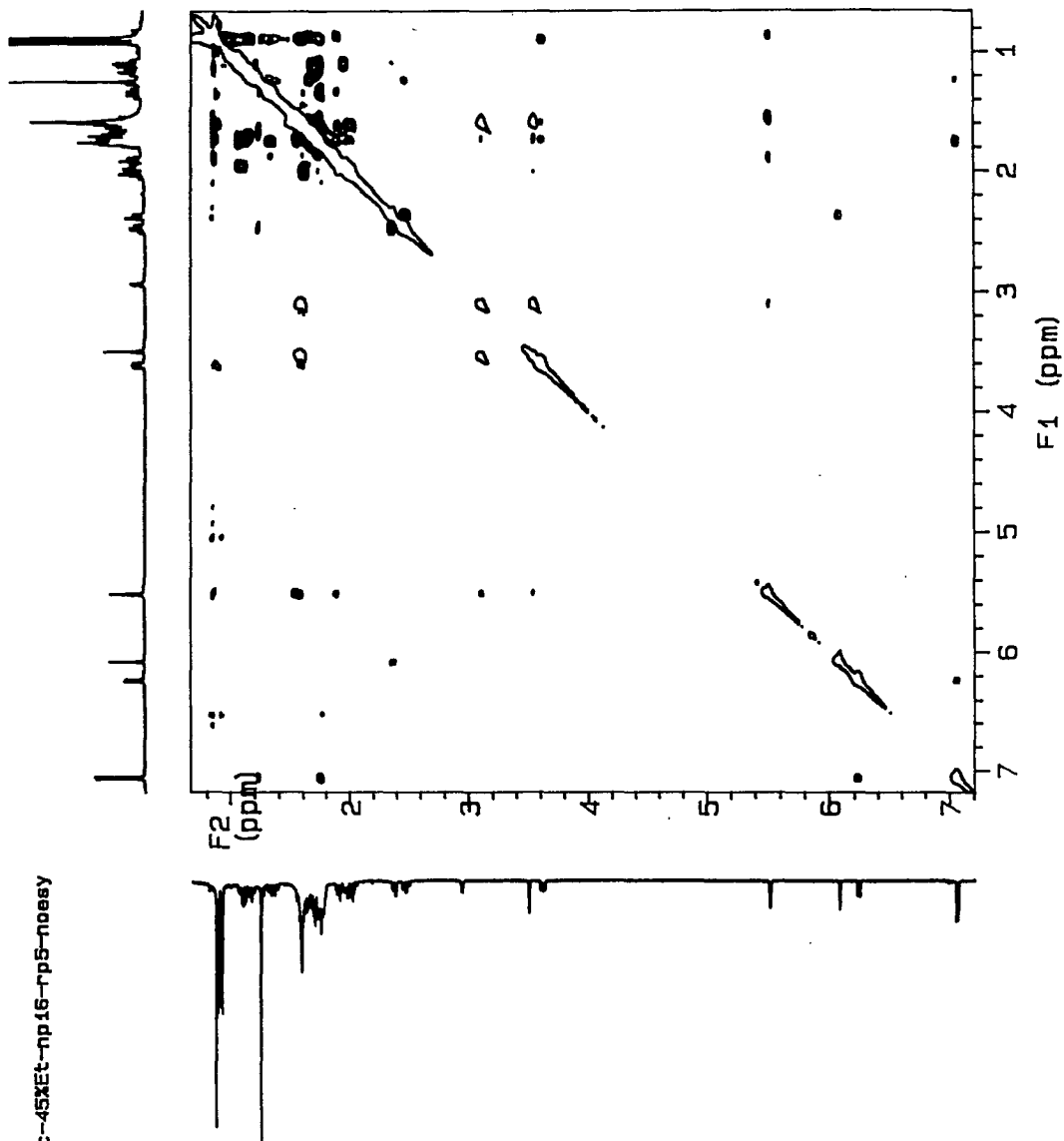


Fig. 2-43. NOESY spectrum of anastomosacetal A(91K-1-A).

91K-1-nfc-30%Et-mp8-mp5-p

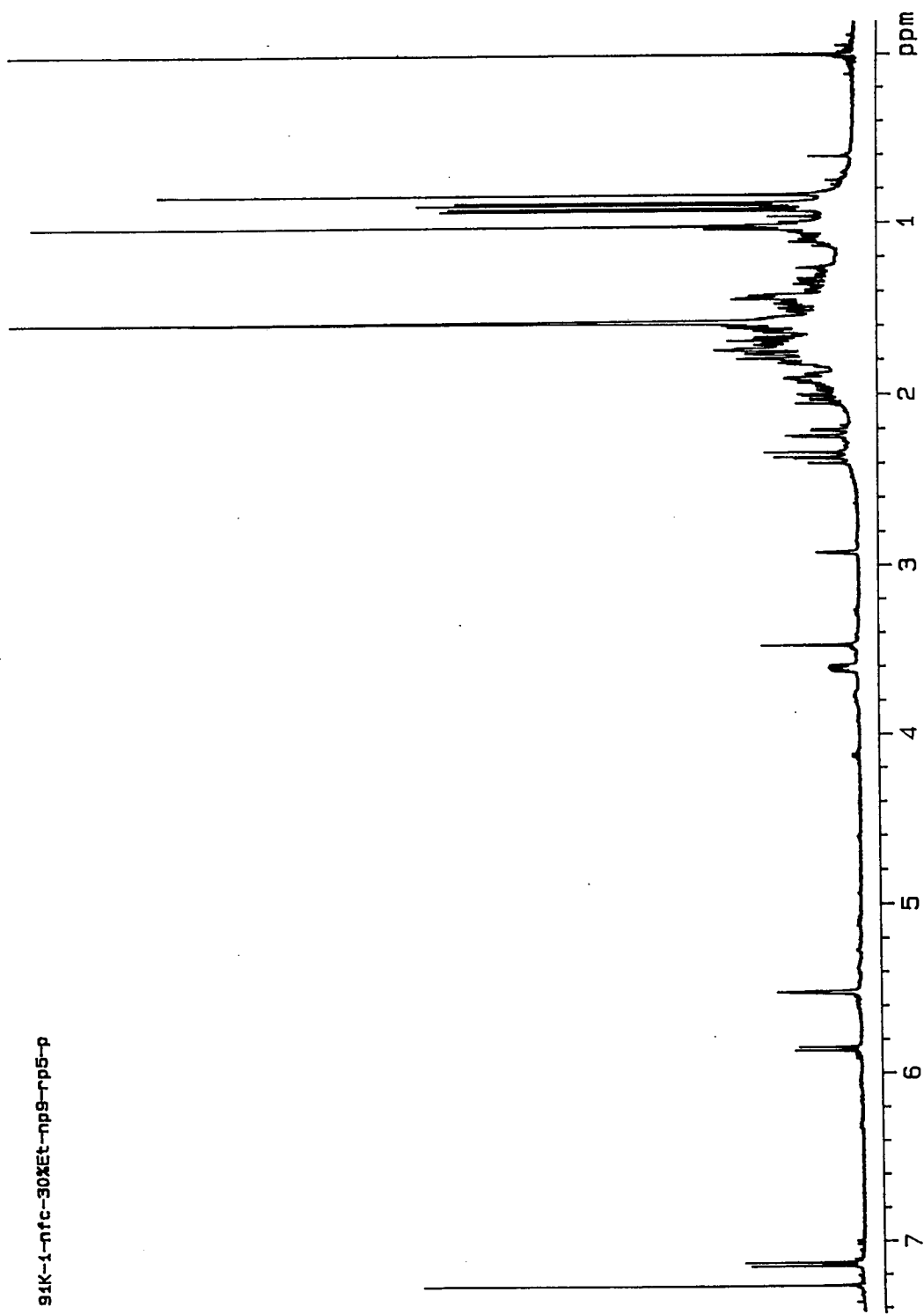


Fig. 2-44. Proton NMR spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).

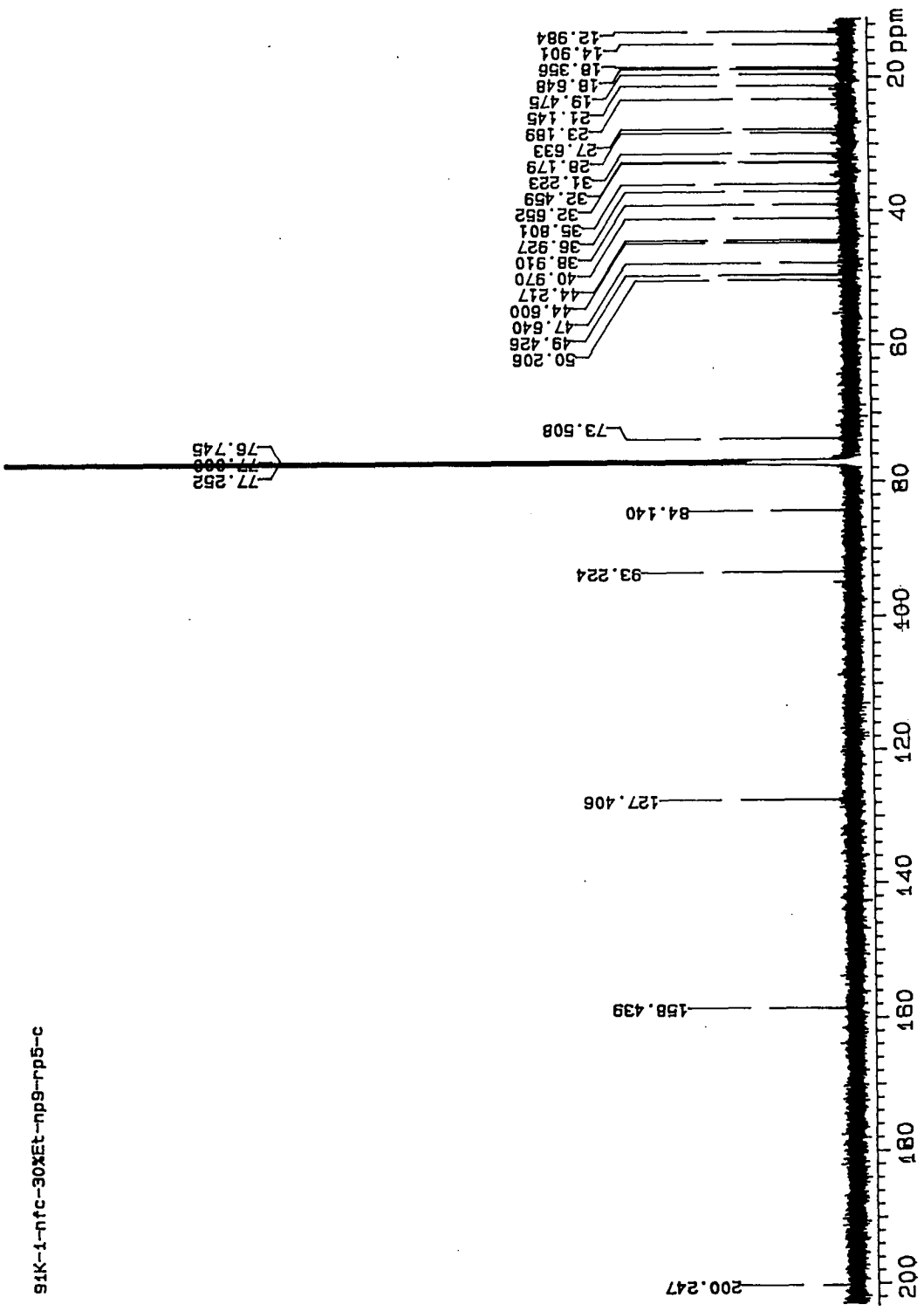


Fig. 2-45. Carbon NMR spectrum of anatosomacetal B(91K-1-B).

91K-1-nfc-30%Et-np9-rp5-dept

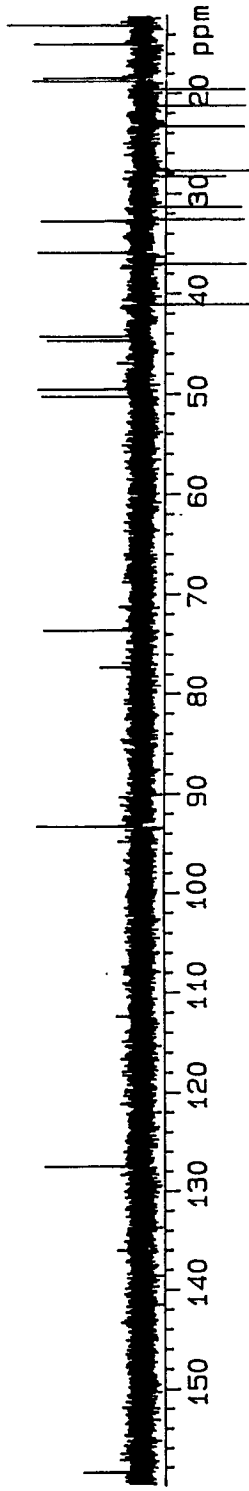


Fig. 2-46. DEPT spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).

91K-1-nfc-30%Et-np9-rp5-cosy45

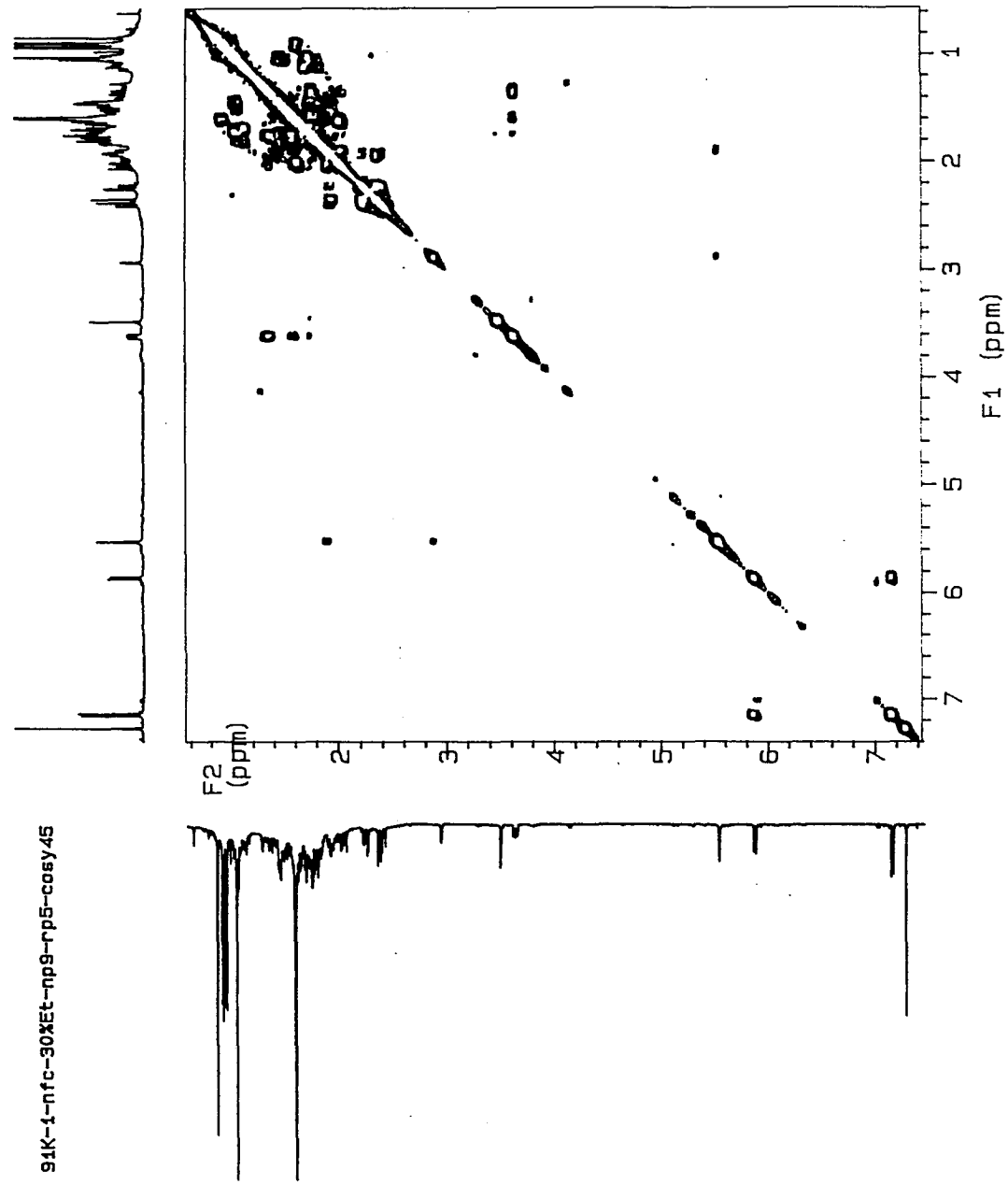


Fig. 2-47. Proton COSY spectrum of anatosmosacetal B(91K-1-B).

91K-1-nfc-30XEt-np9-rp5-hmqc

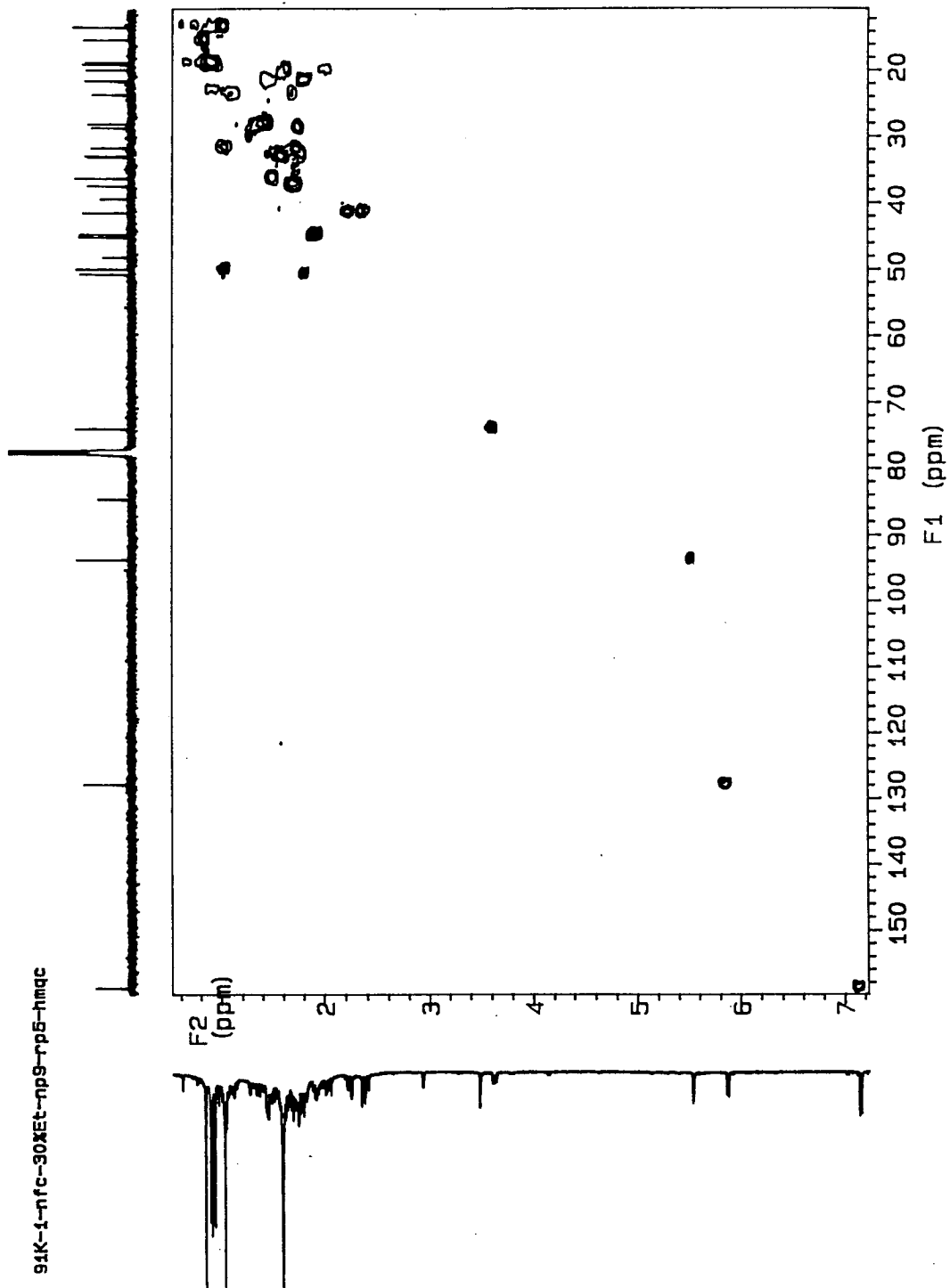


Fig. 2-48. HMQC spectrum of anastomosacetal B(91K-1-B).

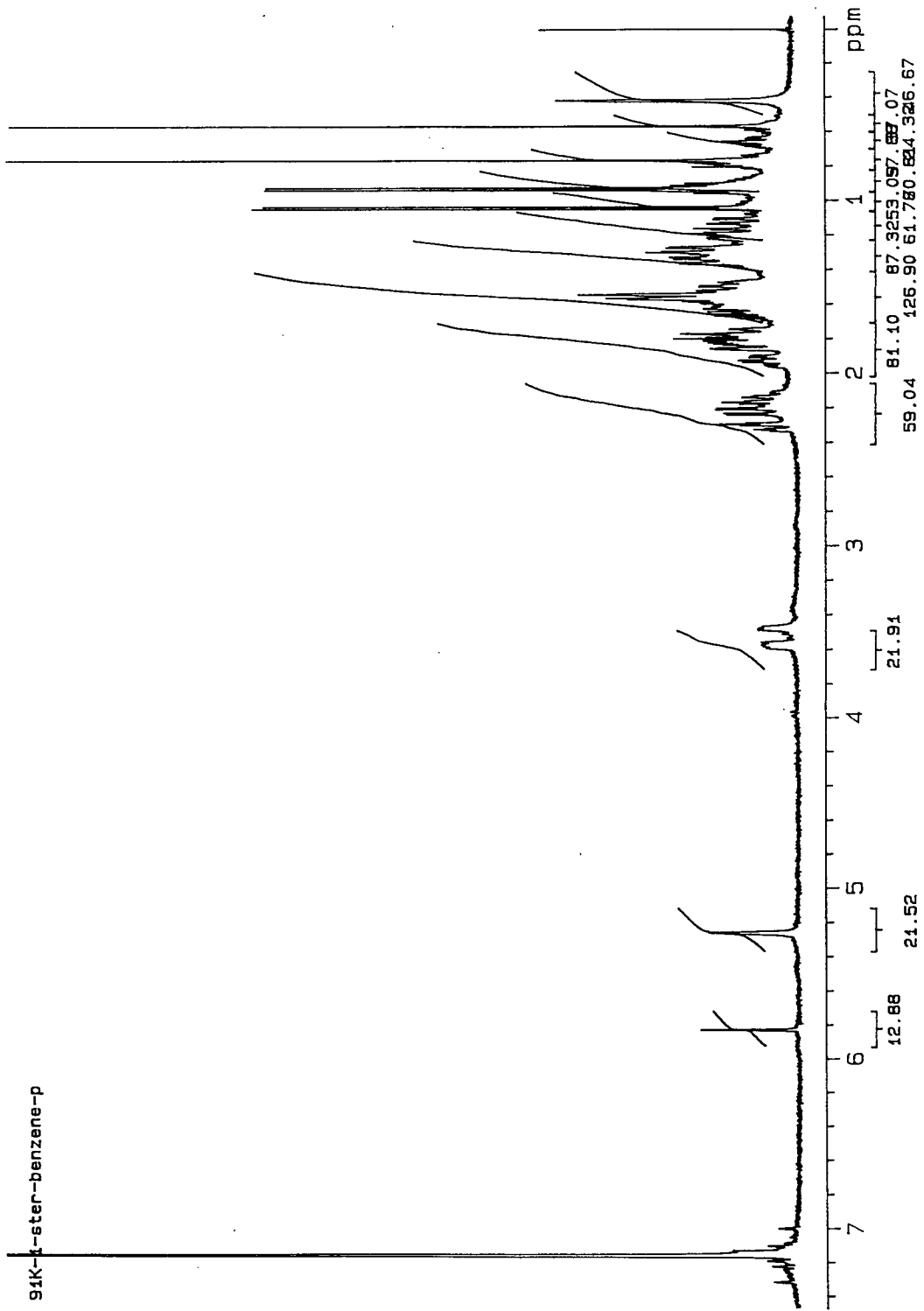


Fig. 2-49. Proton NMR spectrum of anastomosetal C(91K-1-C).

91K-1-ster-benzene-c

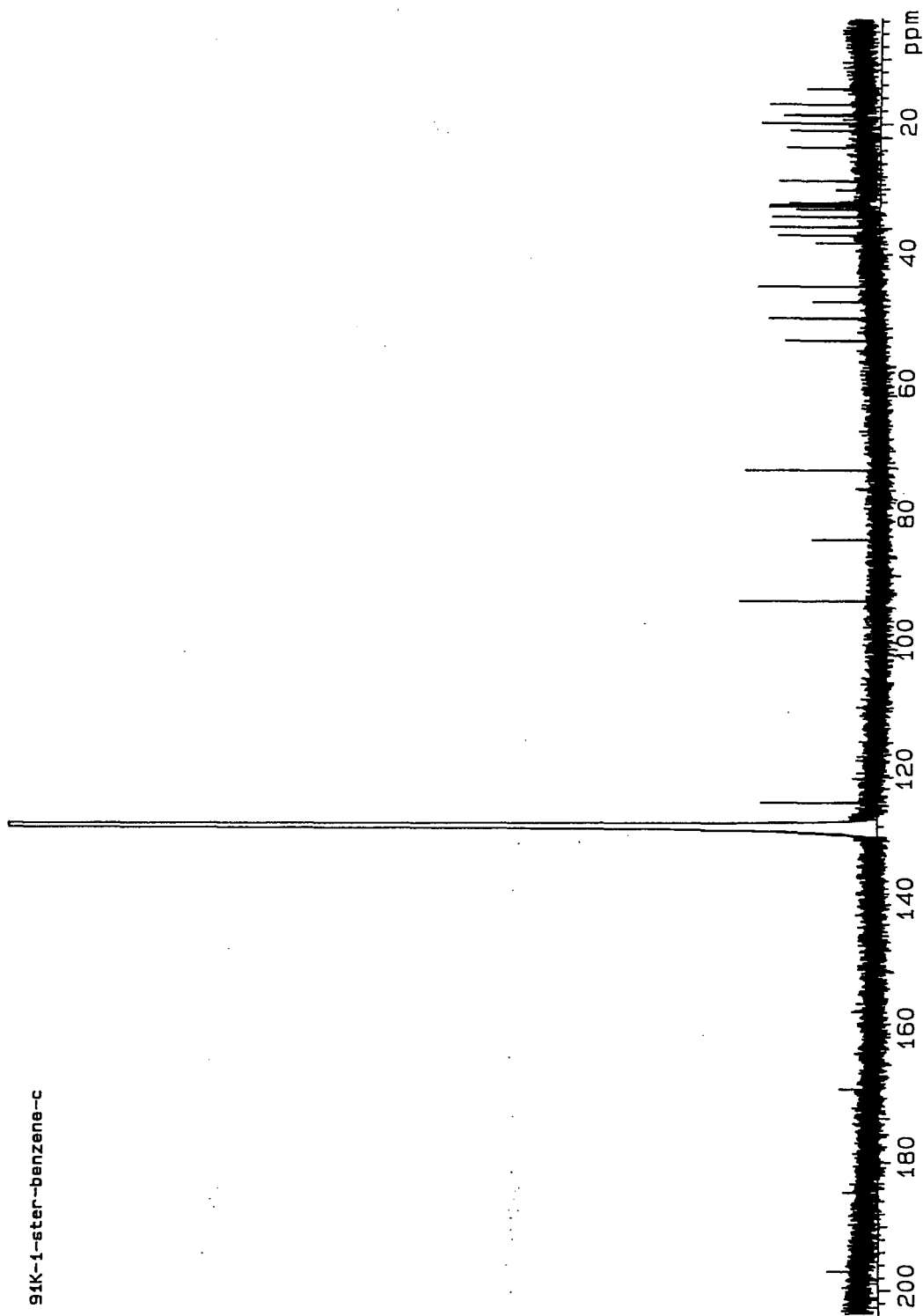


Fig. 2-50. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).

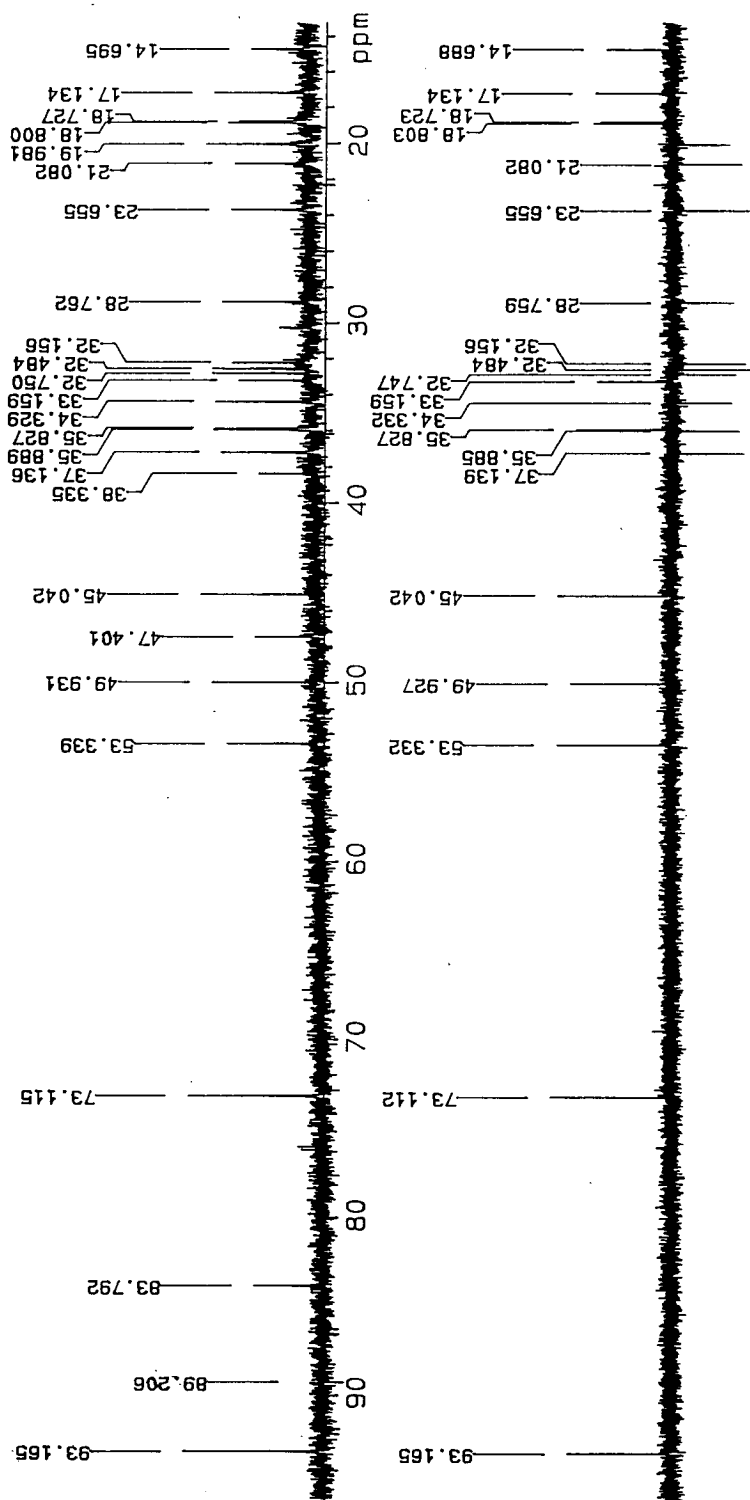


Fig. 2-51. DEPT spectrum of anatosmosacetal C(91K-1-C).

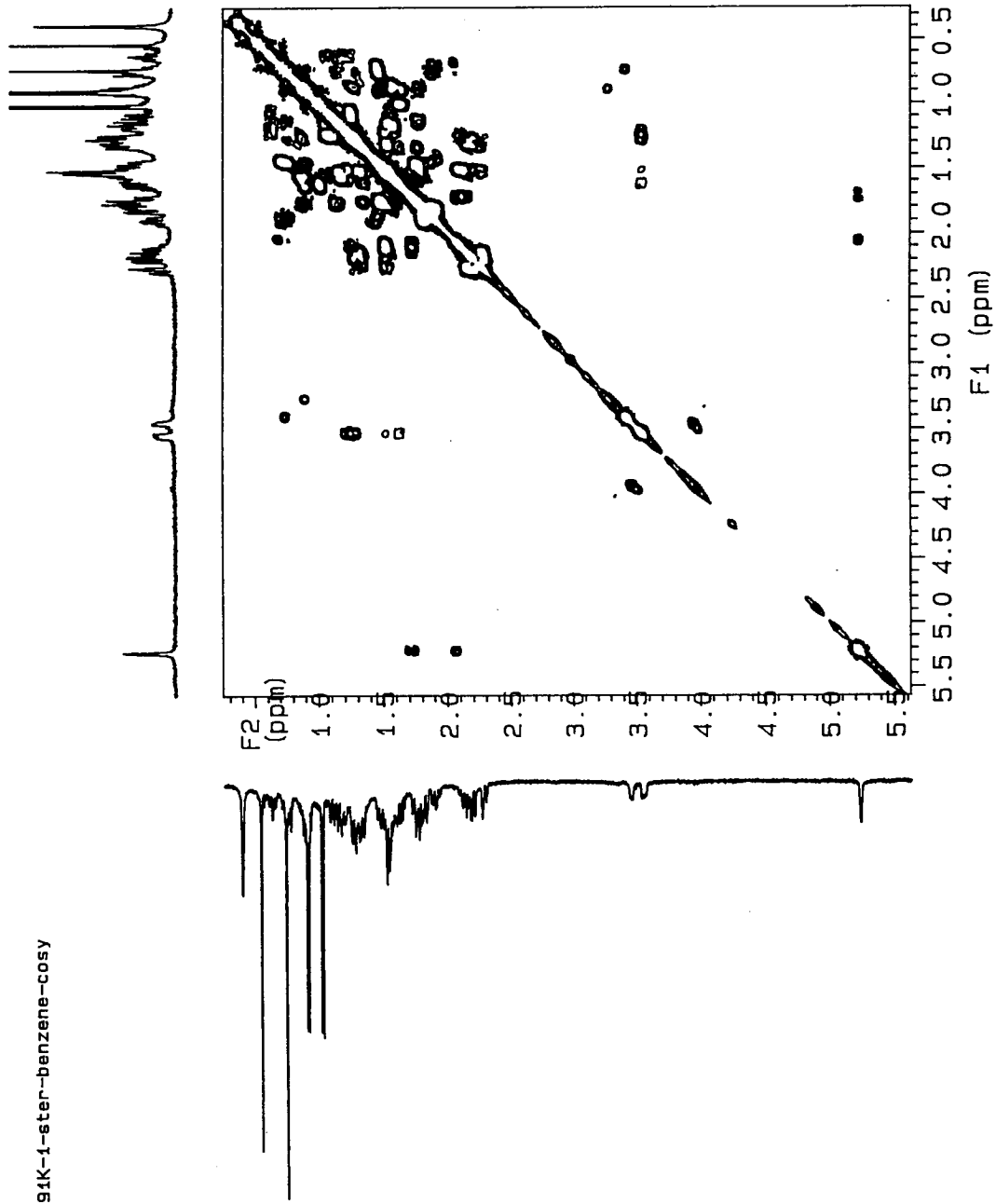


Fig. 2-52. Proton COSY spectrum of anastomosacetal C(91K-1-C).

91K-1-nfc-30XEt-np8-rp4-p

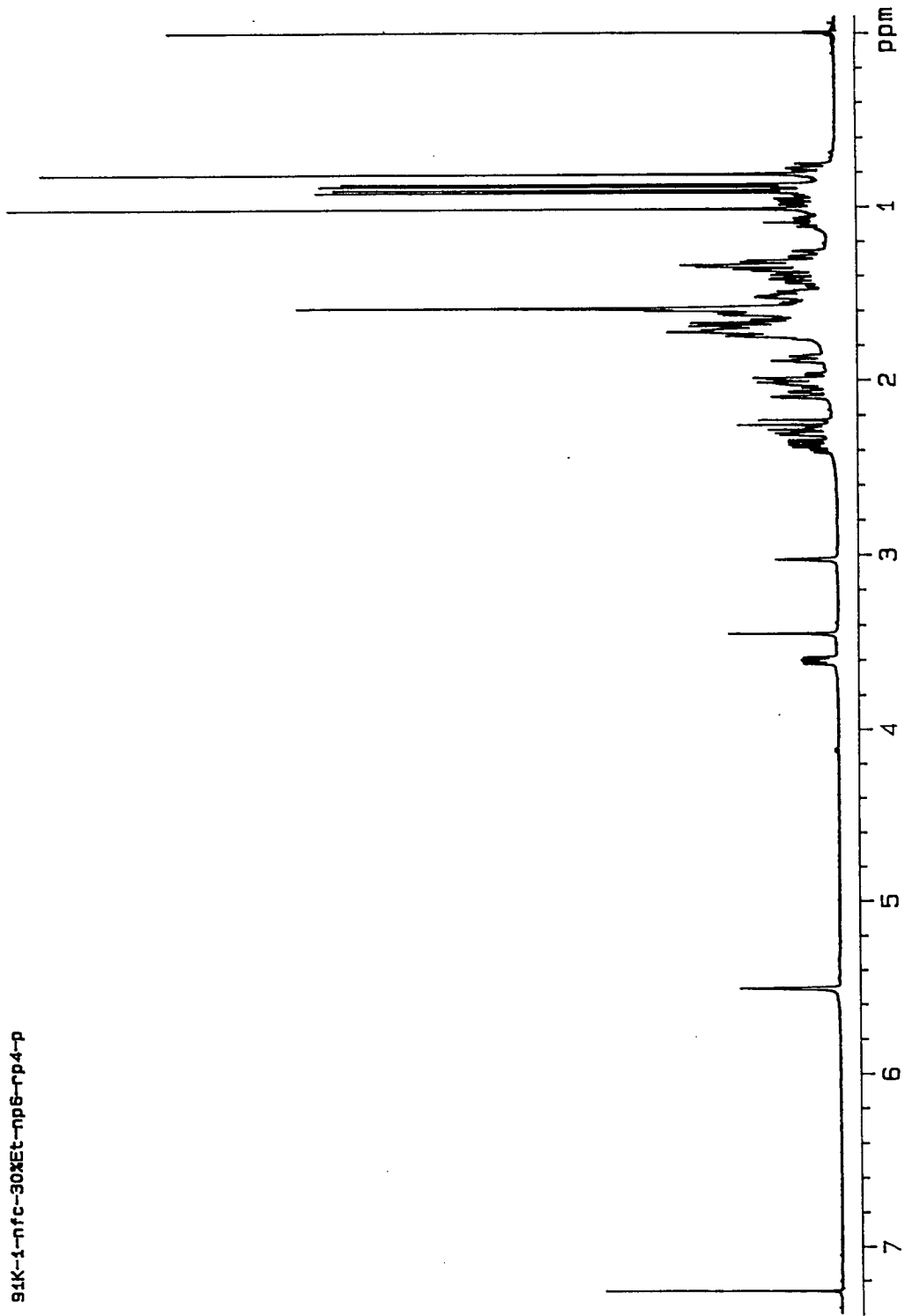


Fig. 2-53. Proton NMR spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).

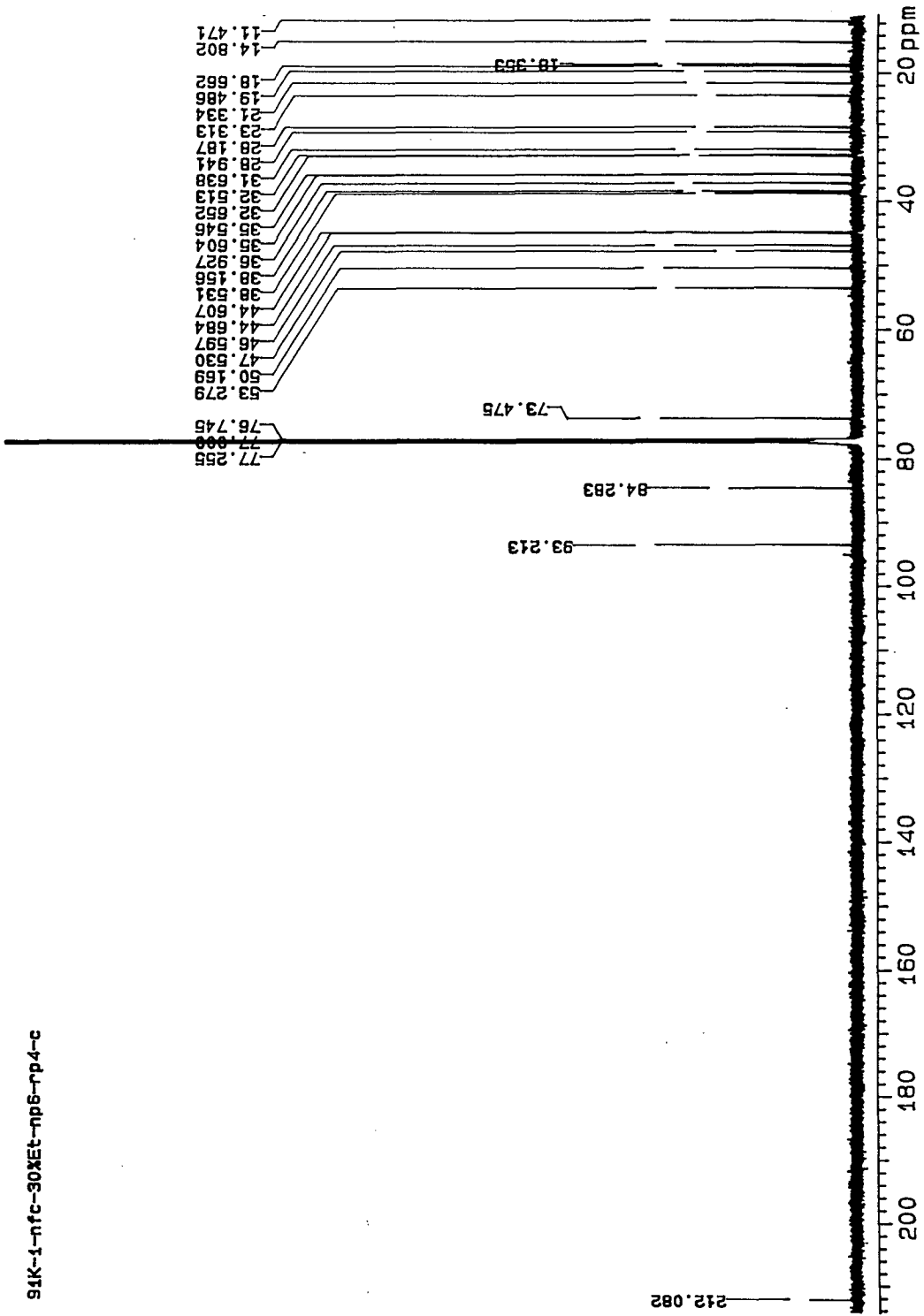


Fig. 2-54. Carbon NMR spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).

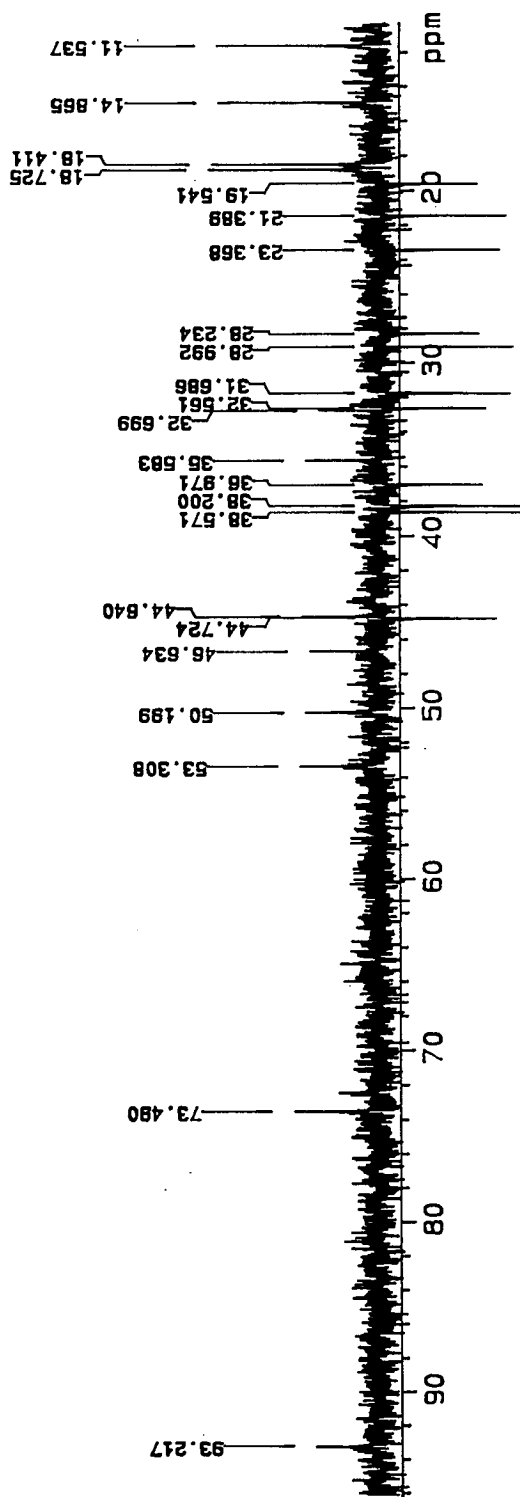


Fig. 2-55. DEPT spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).

91K-1-nfc-30%Et-mp6-pp4-cosy45

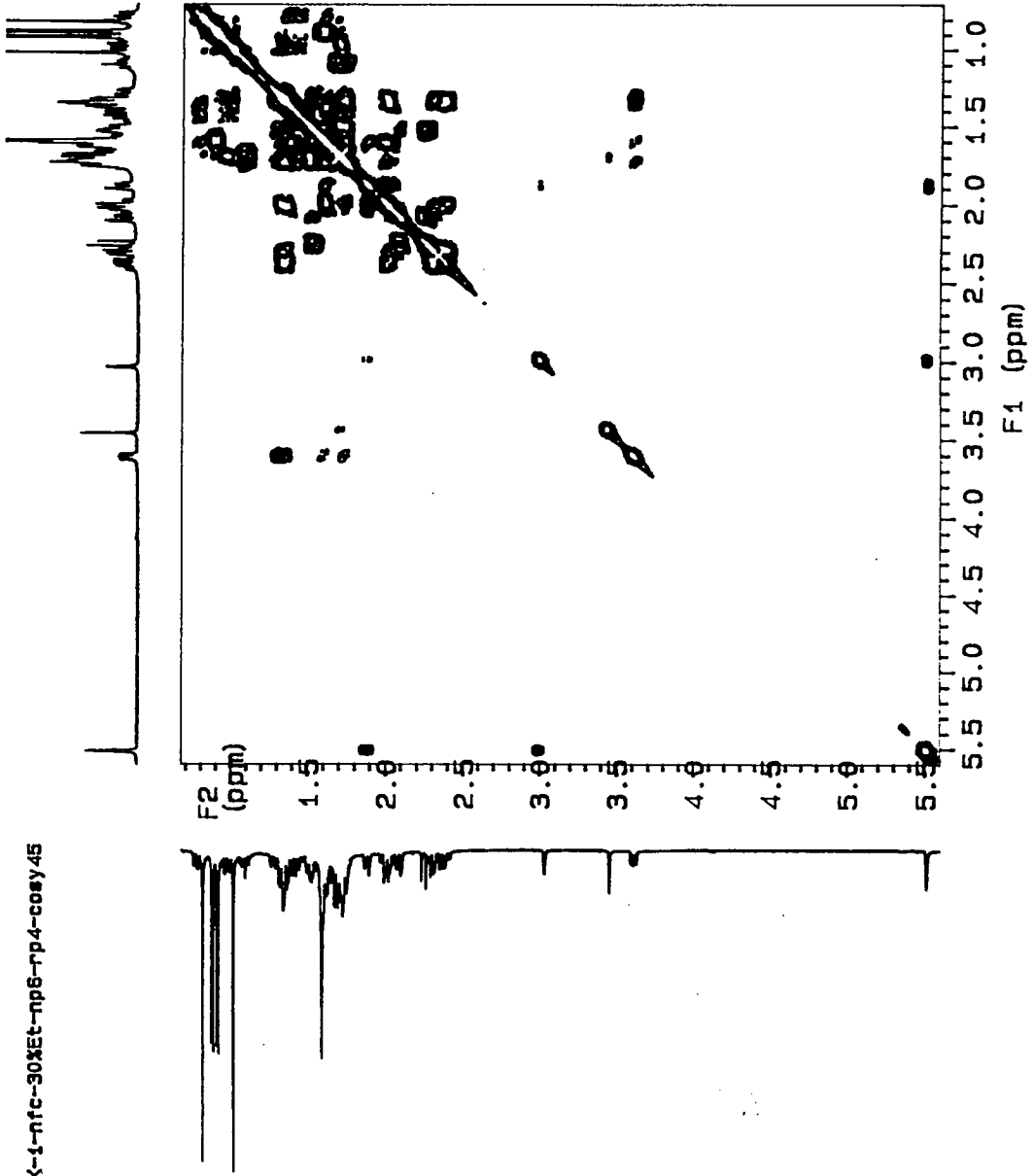


Fig. 2-56. Proton COSY spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).

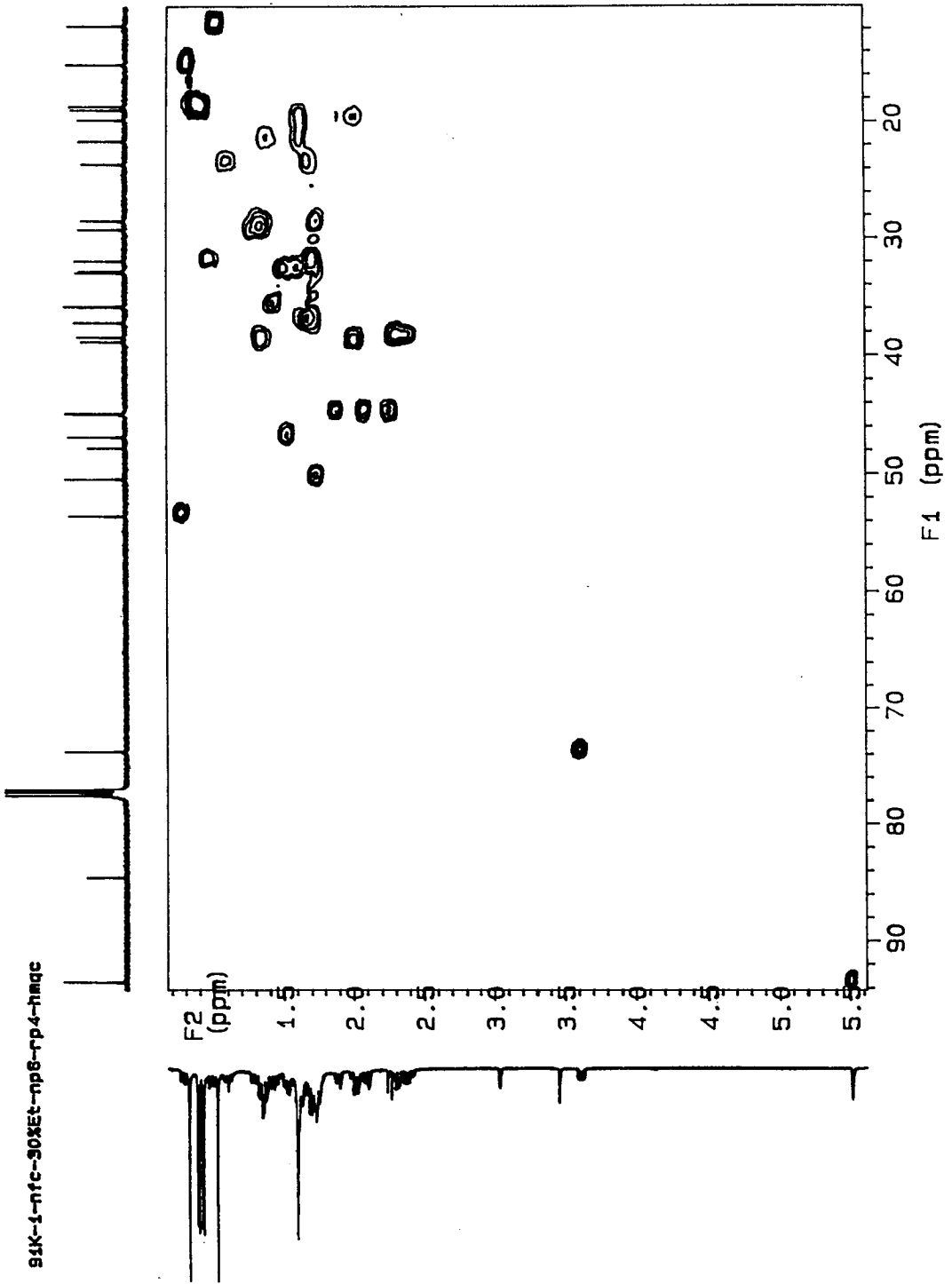


Fig. 2-57. HMQC spectrum of anastomosacetal D(91K-1-D).

제 3 장 Hydroids의 대사물질

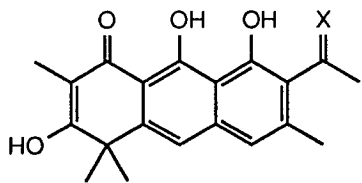
3. 1. 서론

Hydroids(히드라, class Hydrozoa)는 폴립형과 해파리형이 있으며 산호, 해파리등과 더불어 강장동물문(phylum)을 구성하는 중요한 분류군이다. 하지만 천연물 화학적인 연구는 대단히 미미하며 연구가 이루어진 종의 수도 4 종에 불과하여 hydroids의 천연물에 대한 일반적인 경향조차 파악이 되지 않은 실정이다. 물론 강장동물 전체로는 해면과 더불어 천연물 화학적인 연구가 모든 해양생물중 가장 많이 이루어 졌으나 이들의 대부분은 산호 특히 soft corals, gorgonians등 Anthozoa강의 생물에 집중되어있다.

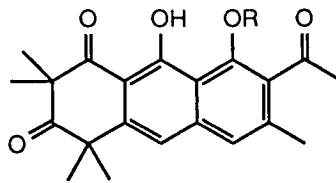
해양 천연물 화학에서 이들 생물이 도외시 되었던 이유로는 효소체계가 편이하여 다량의 대사물질을 생성하지 않는다는 것도 충분한 설득력을 가질 수 있겠으나 가장 큰 이유는 이들의 대부분이 유영생활을 하고, 체내의 수분함유량이 너무 커서 대사물질의 연구를 하기에 충분한 양의 고정조직을 얻기가 대단히 어렵다는 점이다. 그리하여 이들의 화학성분에 대한 연구는 엄밀히 말하여 천연물 화학의 범위를 벗어나는, protein계 독성물질에만 집중되었다. 그러나 최근 몇 종의 부착 hydroids에 대한 연구결과 anthozoans와 마찬가지로 이들 생물 역시 독특한 대사물질을 함유하고 있을 가능성이 높다는 것이 밝혀져 Hydrozoa에 한하여서는 천연물 연구의 가치가 재인식되고 있다.

현재까지 밝혀진 20 여종의 대사물질을 살펴 보면 aromatic polyketides, β -carboline계의 alkaloids, unusual phospholipids, polyhydroxy steroids등이나 이들중 polyketides를 제외한 다른 천연물은 여러 해양생물로부터 흔히 발견되는 물질들이어서 hydroids의 고유한 대사물질로 보기에는 곤란하다(Fig. 3-1; Faulkner, 1996). Hydroids의 대사물질중 독특한 것은 anthraquinone계의 polyketides들로서 이들은 다른 해양 생물로부터는 보기 드문 생합성적 기원과 탄소골격을 갖추고 있다. 이들은 그 수도 비교적 많고 구조적으로도 다양하나 British Columbia에 서식하는 단 한종의 시료(*Garveia annulata*)로부터 분리되었으므로 hydroids의 대표적인 대사물질로 보기에는 어려움이 많다.

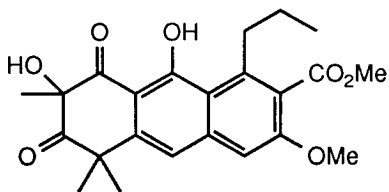
본 연구에서는 제주도와 거문도 근해에서 hydroid *Solanderia secunda*를 다량 채집하였으며 유기조추출물에 대한 생리활성도 여부와 무관하게 이 시료를 일차적인 연구대상에 포함시켰다. 그 이유는 위에서 언급한 바와 같이 hydroids의 천연물에 대한 지식이 매우 빈약하므로 생리활성도를 막론하고 신물질의 추출 및 구조결정은 해양천연물 연구에 있어서 중요한 기여로 판단되었기 때문이다.



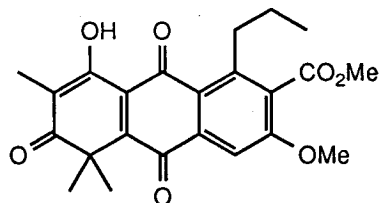
garveatins A (X = O) and B (X = H₂)



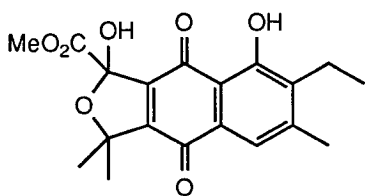
garveatins C (R = Me) and D (R = H)



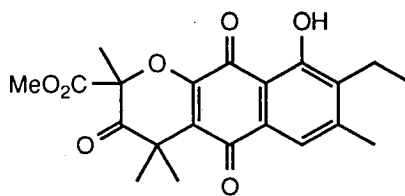
2-hydroxygarvin A



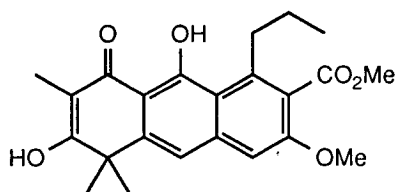
garvin A quinone



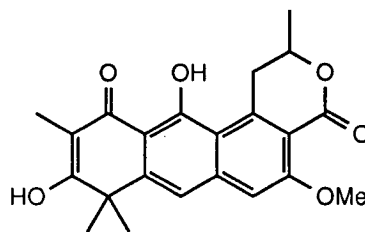
annulin A



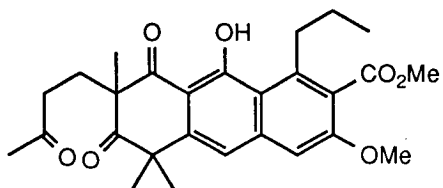
annulin B



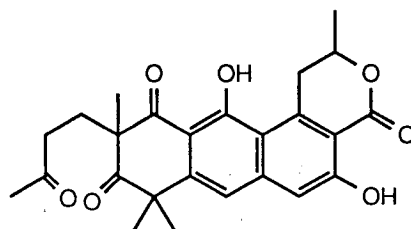
garvin A



garvin B



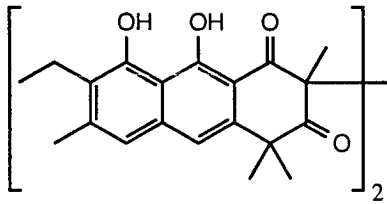
garvalone A



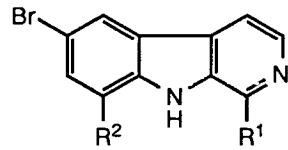
garvalone B

aromatic polyketides isolated from *Garveia annulata*

Fig. 3-1. Metabolites of hydroids.



(*Garveia annulata*)

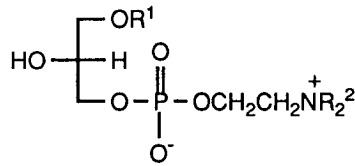


$R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{H}$

$R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H}$

$R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{Br}$

(*Agalophenia pluma*)

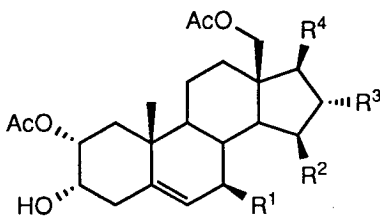


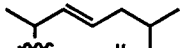
$R^1 = \text{C}_{16}\text{H}_{33}, R^2 = \text{Me}$


$R^1 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}, R^2 = \text{Me}$


$R^1 = \text{CH}=\text{CHC}_{14}\text{H}_{29}, R^2 = \text{H}$

(*Solanderia secunda*)

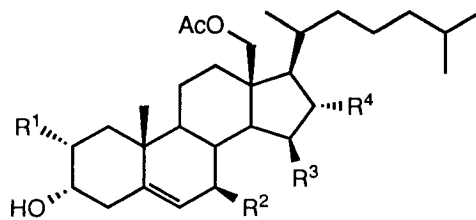


$R^1 = R^2 = \text{H}, R^3 = \text{OAc}, R^4 =$ 

$R^1 = R^3 = \text{H}, R^2 = \text{OAc}, R^4 =$ 

$R^1 = R^2 = \text{OAc}, R^3 = \text{H}, R^4 =$ 

(*Eudendrium glomeratum*)



$R^1 = R^4 = \text{OAc}, R^2 = R^3 = \text{H}$

$R^1 = R^4 = \text{H}, R^2 = R^3 = \text{OAc}$

(*E. glomeratum*)

Fig. 3-1. Continued.

3. 2. *Solanderia secunda*의 대사물질

우리 나라의 거문도에 속하는 서도와 대삼부도 및 서귀포시 연안해역에서 hydroid *Solanderia secunda* 약 10 kg을 채집하였다. *S. secunda*는 우리 나라 남해안 일대에서 가장 흔히 발견되는 강장동물들중의 하나이다. 외관상으로 gorgonians와 아주 흡사하여 현지 주민들은 목산호라고 부른다. 이 생물은 군체의 길이가 20 - 40 cm정도로써 부채살(fan) 모양을 하고 있으며 진한 갈색을 띄고 있다. 그러나 군체의 내부중심에 gorgonin이라고 불리는 chitin질의 골격이 없는 점에서 gorgonians와 구별 된다.

냉동보관했던 시료를 그늘에서 건조시켜 수분을 제거한 후에 dichloromethane을 이용하여 유기물질을 추출하고 용매는 진공증발기로 제거하였다. 용매를 제거한 후에 남은 잔류물을 silica vacuum flash chromatography를 하여 몇 개의 분획으로 나눈 후에 C₁₈ reversed-phase HPLC를 이용하여 모두 9개의 물질(solandelactones A-I: 91-10-A ~-I)을 분리하였다(Fig. 3-2).

Solanderlactone A(91-10-A)가 viscous liquid의 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석과 ¹³C NMR에 의해서 C₂₂H₃₆O₄로 확인되었다(Fig. 3-9). δ 176.57에 나타난 carbon signal과 IR 스펙트럼에 보여진 1730 cm⁻¹의 흡수 band는 이 물질이 한 개의 락톤기(lactone functionality)를 가지고 있음을 보여 주었다. ¹³C NMR에서는 모두 22개의 signals 이 발견되었으나 carbonyl peak를 제외하고 quaternary 및 aliphatic methine carbon이 하나도 발견되지 않았기 때문에 이 물질은 지방산에서 유래된 것으로 생각되었다. ¹³C NMR의 upfield region에 나타난 δ 23.04(CH), 21.43(CH), 7.88(CH₂) 및 ¹H NMR의 δ 0.60-1.15 영역에 나타난 peaks들은 하나의 cyclopropane ring이 존재하는 것을 나타내 주었다(Fig. 3-8).

Solandelactone A의 전체적인 구조는 ¹H COSY와 HMQC 실험에 의해서 결정되었다(Fig. 3-10 ~ 3-12). 이 물질은 C-7, C-11 및 C-14에 산화된 탄소들을 가지고 있는 것이 수소와 탄소 NMR에서 확인되었기 때문에 solandelactone A를 pyridine에 녹이고 acetic anhydride와 반응시켰더니 주생성물로 diacetate (91-10-J)가 얻어 졌다(Fig. 3-46 ~3-48). ¹H NMR로 확인한 결과 H-7의 수소는 거의 변화하지 않은데 비해 H-11과 H-14는 각각 1.19와 1.09 ppm 씩 이동하였기 때문에 이 물질은 8각형 고리를 가지고 있음이 분명하며, 이 사실은 HMBC 실험에서 확인된 carbonyl carbon과 H-7 사이에 발견되는 long-range correlation에 의해서도 확인되었다(Fig. 3-46, 3-13). 이와 같이 solandelactone A(91-10-A)은 cyclopropyl ring을 포함하는 fatty acid lactone임이 분명하였다.

Solandelactone A는 C-12와 C-16에 두 개의 이중결합을 보유하고 있다. 이 이중결합들의 geometry는 인접하고 있는 allylic proton들을 decoupling한 후 olefinic proton들의 coupling constants를 측정함으로써 각각 12E와 16Z로 결정되었다($J_{12,13} = 15.6$ Hz; $J_{16,17} = 10.8$ Hz). Cyclopropyl ring의 geometry도 같은 방법을 사용하여 trans로 결정되었다($J_{8,9} = J_{9,10} = 8.8$ 과 5.4 Hz). 비대칭 탄소원자들(C-7, C-8, C-10, C-11, C-14)의 상대 및 절대배열은 뒤에 논의되어

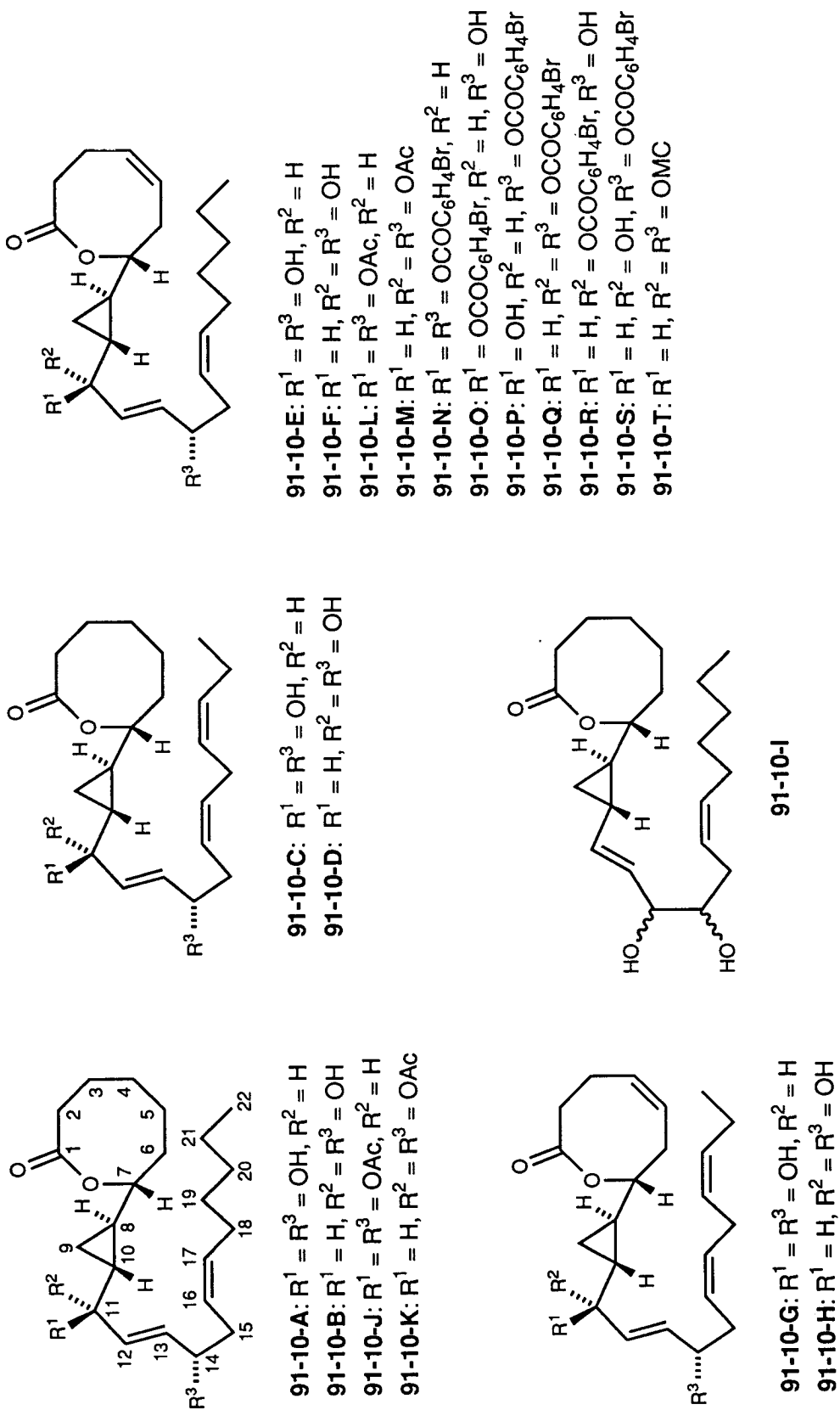


Fig. 3-2. Structures of solandelactones A-I and semi-synthetic derivatives.

진다.

구조적으로 밀접하게 관련된 대사물질 solandelactone B(91-10-B)가 점액성의 액체로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석과 ^{13}C NMR에 의하여 $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 로 결정되었다(Fig. 3-15). 이 물질의 NMR 데이터는 화합물 solandelactone A(91-10-A)에서 얻어진 것과 거의 동일하였다(Fig. 3-14 ~ 3-19). 하지만 두 물질(1과 2)의 ^{13}C NMR을 비교해 보면 C-9 ~ C-12의 chemical shift 차이($\Delta\delta$ 0.14 ~ 1.08)가 다른 것들($\Delta\delta$ 0 ~ 0.14)에 비해서 크게 나타났다. 이 사실은 화합물 91-10-A와 B가 대칭 탄소 원자 C-10과 C-11중의 어느 하나에서 서로 epimer 관계에 있다는 것을 나타내 준다.

Sandelactone B의 H-9 proton signal들이 서로 겹쳐 있기 때문에 이 화합물을 pyridine에 녹이고 acetic anhydride와 반응을 시켜 diacetate(91-10-K)로 변환을 시켰다(Fig. 3-49 ~ 3-52). 이렇게 해서 분리된 H-9 proton signal들 각각에 대해서 proton decoupling 실험을 한 결과 91-10-J와 동일한 trans geometry를 가진다는 것이 확인되었다. 하지만 H-11과 인접한 수소들간의 coupling constants를 측정한 결과 중요한 차이점이 발견되었다(Fig. 3-46, 3-49). 화합물 91-10-J에서는 H-11과 H-10, H-12, H-13 간의 coupling constants가 각각 3.2, 8.3, 1.5 Hz인 반면에 91-10-K에서는 7.3, 5.4, 0 Hz의 값을 나타내었다. 그러므로 solandelactone B는 solandelactone A의 11-epimer로 결정되었다(Fig. 3-2).

두 개의 밀접하게 관련된 대사물질 solandelactones C(91-10-C)와 D(91-10-D)가 같은 HPLC 조건에서 분리되었다(50% acetonitrile/water). 이 물질들의 NMR 스펙트럼은 solandelactones A와 B와 대단히 유사하였으며 유일한 차이점은 이중결합 하나가 추가적으로 나타났다(Fig. 3-20 ~ 3-25). 이 이중결합의 위치는 ^1H COSY와 HMQC 실험에 의하여 C-19으로 결정되었으며 coupling constant를 측정한 값(91-10-C와 -D에 대해서 각각 $J_{19,20} = 11.2$ 와 12.2 Hz)에 의해서 Z geometry를 갖는 것으로 확인되었다(Fig. 3-2).

Soandelactone E(91-10-E)와 F(91-10-F)가 oil 형태로 얻어 졌다. 이 물질들의 분자식은 고분별능 질량분석과 ^{13}C NMR에 의해서 $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 으로 결정되었으며 이들의 구조는 NMR 스펙트럼 분석에 의하여 solandelactones A와 B의 4,5-didehydro 유도체들로 밝혀졌다(Fig. 3-26 ~ 3-34). 새로운 이중결합의 geometry는 coupling constant 측정에 의하여 양쪽 화합물 모두 Z로 확인되었다(5, 11.3 Hz; 6, 11.7 Hz) (Fig. 3-2).

두 개의 지방산 락톤, solandelactones G(91-10-G)와 H(91-10-H)가 역시 기름형태로 분리되었다. 분자식 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 는 고분별능 질량분석과 ^{13}C NMR에 의하여 결정되었으며 이 물질들의 전체적인 구조는 ^1H COSY와 HMQC 실험에 의하여 solandelactones A과 B의 4,5,19,20-tetrahydro 유도체들로 확인되었다(Fig. 3-36 ~ 3-41). 이중결합들의 geometry는 allylic proton들을 decoupling한 후 coupling constant를 측정함으로써 4Z, 12E, 16Z, 19Z로 결정되었다(Fig. 3-2).

Sandelactone A-H(91-10-A ~ -H)는 같은 위치(C-7, C-8, C-10, C-11, C-14)에 비대칭 탄소중심원자들을 가지고 있다. 이 탄소원자들의 상대 및 절대배열은 Nagle과 Gerwick이 홍

조류 *Constantinea simplex*에서 분리된 oxylipins, constanolactones A와 B의 입체구조를 결정하기 위하여 사용한 방법을 이용하여 확인되었다(Nagle and Gerwick, 1990; 1994; Fig. 3-4). Solandelactone E와 F가 수득율이 가장 높고 락톤고리에 이중결합이 하나 있어 고리의 유동성이 낮기 때문에 입체화학적 구조연구를 위한 대상물질로 선정되었으며 가장 안정된 conformer를 얻기 위하여 pyridine에 녹이고 acetic anhydride로 처리하여 diacetate 유도체들(91-10-L와 91-10-M)로 바꾸었다(Fig. 3-53 ~ 3-62). Solandelactone E diacetate (91-10-L)의 NOESY 스펙트럼에서 cyclopropane ring과 그 주변의 수소들간에 여러 개의 상호작용이 나타났다(Fig. 3-57). H-7 수소는 H-9 β (δ 0.78)와 H-10 그리고 H-11 수소는 H-8과 H-9 α (δ 0.60) 수소들간에 correlation이 발견되었으며 또 H-8 수소는 H-6 α 와 H-6 β , H-10 수소는 H-6 β 수소들간에 correlation을 보여 주었다. 이 외에도 H-12 수소가 H-9 α 와 H-10 수소들간에 상호작용을 나타냈다. 그러므로 91-10-L에서 C-7 ~ C-11 사이의 상대배열은 7R*, 8R*, 10R*, 11S*로 결정되었다(Fig. 3-3). Solandelactone F diacetate(91-10-M)의 NOESY 실험에서 얻어진 데이터중에서 lactone 수소들과 cyclopropyl 수소들간의 상호작용은 91-10-L에서 얻어진 것과 동일했으나 H-12 수소의 nOe 상호작용은 증대한 차이점을 보여 주었다(Fig. 3-62). 화합물 91-10-L의 경우에 H-12 수소가 H-9 α 와 H-10 수소들간에 correlation을 나타 낸 반면에 화합물 91-10-M에서는 그림에서 보여진 것처럼 H-12 수소가 H-8과 H-10 수소들간에 상호작용을 보여 주었다. 이 차이점은 화합물 91-10-L와 -M이 C-11에서 서로 반대되는 배열을 가지기 때문인 것으로 생각된다(Fig. 3-3).

이 결과를 관련된 다른 화합물들의 입체배열과 비교해 보면 cyclopropyl과 lactone 고리 사이의 상대배열에서 증대한 차이점이 발견된다. 홍조류 *C. simplex*의 대사물질 constanolactones A와 B는 상대배열이 5R*, 6S*, 8S*, 9S*와 5R*, 6S*, 8S*, 9R*로 보고되었으며 해면 *Halichondria okadai*와 갈조류 *Laminaria sinclairii*로부터 분리된 halicholactone은 상대배열이 8R*, 9S*, 11S*, 12R*인 것으로 확인되었다(Nagle and Gerwick, 1990; 1994; Niwa *et al*, 1989; Kigoshi *et al*, 1991; Critcher *et al*, 1995)(Fig. 3-4). 이 물질들과 solandelactone들의 3차원 분자모델을 만들어서 자세하게 관찰해 보면 C-9 methylene 수소들이 91-10-L와 -M에서는 락톤고리의 산소를 향하고 있는 반면에 constanolactone과 halicholactone에서는 C-6 methylene 수소들을 향하고 있다.

Solandelactone들의 절대구조는 CD 측정과 화학변환에 의하여 결정되었다. Solandelactones E(91-10-E)와 F(91-10-F)를 각각 pyridine/dichloromethane의 혼합용매에 녹이고 *p*-bromobenzoyl chloride와 반응시키면 bis(*p*-bromobenzoyl), 11-(*p*-bromobenzoyl), 14-(*p*-bromobenzoyl) 유도체들(91-10-E로부터 91-10-N, O, P; 91-10-F로부터 91-10-Q, -R, -S)이 얻어 졌다(Fig. 3-63 ~ 3-68). 여기에 존재하는 비대칭 중심탄소들의 상대배열에 대한 확인작업은 91-10-N과 91-10-Q에 대한 NOESY 실험에 의하여 이루어 졌으며 diacetate 91-10-L와 91-10-M의 NOESY 실험에서도 대단히 유사한 결과가 얻어 졌다(Fig. 3-57, 3-62, 3-65, 3-68). 하지만 약간의 차이점이 발견되었는데 H-6 β 수소와 H-8, H-10 사이에 존재하는

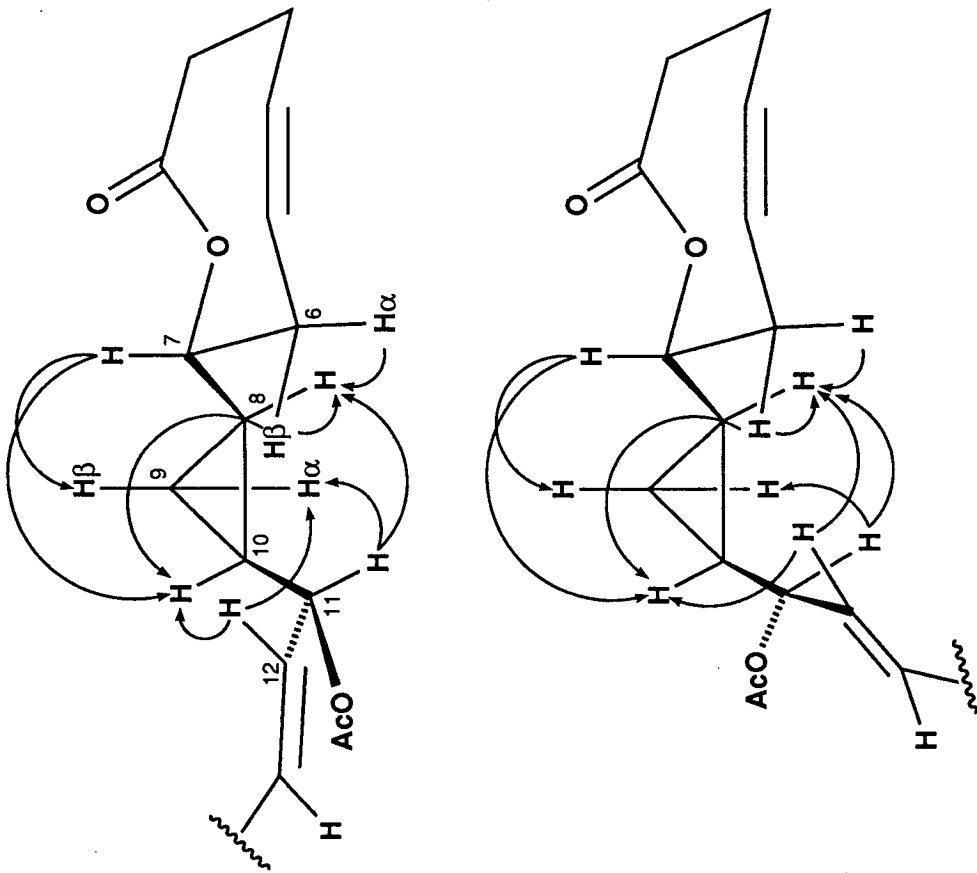
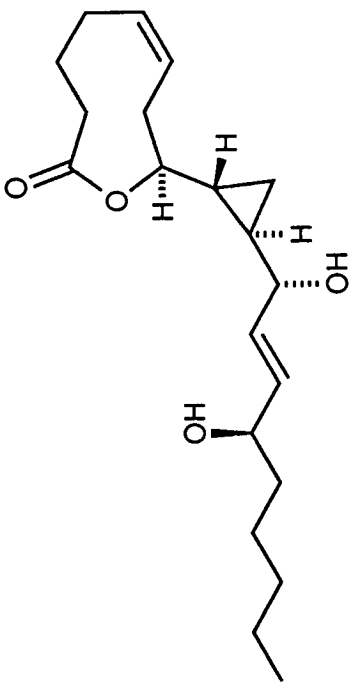
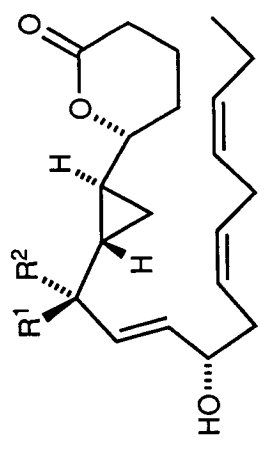


Fig. 3-3. Selected nOe correlations based on NOESY experiments of 91-10-L and -M.



halicholactone
(sponge *Halichondria okadaei*)



constanolactones A ($R^1 = H, R^2 = OH$)
and B ($R^1 = OH, R^2 = H$)
(red alga *Constantinea simplex*)

Fig. 3-4. Structures of the known oxylipins constanolactones and halicholactone.

correlation이 bis(*p*-bromobenzoyl) 유도체들(91-10-N과 91-10-Q)인 경우에는 나타나지 않았다. 이것은 아마 C-11의 비대칭 탄소중심에 존재하는 acetoxy기가 입체장애가 큰 *p*-bromobenzoyl기에 의하여 치환됨에 따라 발생한 conformation의 변화로 인하여 나타난 현상으로 여겨진다. 91-10-R의 CD 스펙트럼은 242.5 nm에서 최대치를 나타내었다($\Delta\epsilon$ +7.13). 그러므로 C-11 비대칭 탄소중심의 절대배열은 *R*로 결정되었다. 또 다른 epimer의 경우에는 물질의 불안정성 때문에 CD 스펙트럼은 측정하지 못하였지만 NOESY 실험의 결과에 의하여 C-11의 절대배열은 *S*로 결정되었다(Fig. 3-5).

비대칭 탄소중심 C-14의 절대배열도 대사물질 solandelactones E(91-10-E)와 F(91-10-F)의 14-(*p*-bromobenzoyl) 유도체들인 91-10-P과 91-10-S의 CD 스펙트럼 측정에 의하여 밝혀졌다. 91-10-P과 91-10-S의 CD 스펙트럼은 거의 동일한 파장에서 최대치를 보였으며 유사한 강도를 나타내었다(91-10-P, 242.3 nm, $\Delta\epsilon$ +10.67; 91-10-S, 241.8 nm, $\Delta\epsilon$ +13.67). 따라서 양쪽 화합물들에 대한 C-14의 절대배열은 *S*로 확인되었다. 이 해석은 solandelactone F(91-10-F)의 유도체인 bis(methoxycarbonyl)solanadelactone(91-10-T)의 ozonolysis에 의하여 얻어진 실험결과에 의해서도 지지를 받는다. 화합물 91-10-F을 toluene/pyridine의 혼합용매에 녹이고 (-)-menthoxycarbonyl(MC) chloride와 반응시키면 bis(menthoxycarbonyl) 유도체(91-10-T)가 얻어졌다(Fig. 3-69, 3-70). 이 물질을 ozonolysis 하고 35% 과산화수소로 산화시킨 후에 diazomethane으로 methylation 시켜 dimethyl-MC-malate가 얻어졌다(Fig. 3-6). 이 생성물의 ^1H NMR 스펙트럼과 합성한 2*S*와 2*R* dimethyl-MC-malate의 스펙트럼을 비교해 본 결과 2*S*-configuration을 갖는다는 것이 확인되었다(Fig. 3-71, 3-72). 또 이 생성물을 GC 분석을 이용해서 authentic sample과 나타난 retention time을 비교해 본 결과 2*S*-dimethyl-MC-malate와 대단히 유사한 값을 주었다. 이 모든 결과들을 종합해 보면 solandelactone E(91-10-E)의 절대배열은 7*R*,8*R*,10*R*,11*S*,14*S*로 결정되었으며 대사물질 91-10-E의 11-epimer인 solandelactone F(91-10-F)의 절대배열은 7*R*,8*R*,10*R*,11*R*,14*S*로 확인되었다.

^{13}C NMR 데이터들을 분석해 보면 C-8 ~ C-12에 있는 탄소들의 chemical shift들은 hydroxyl기를 가지고 있는 C-11의 입체화학적 구조에 의해서 영향을 받는다는 것이 확인되었다. Solandelactone E(91-10-E)의 탄소 chemical shift 값들은 C-9, C-10, C-11, C-12에 대해서는 solandelactone F(91-10-F) 보다 더 shield 되어 있었으며 C-8에 대해서는 그 반대였다. 이 해석에 근거해서 서로 11-epimer 관계인 solandelactone들의 입체화학적 관계를 조사한 결과 화합물 91-10-E는 91-10-A, -C, -G와 화합물 91-10-F는 91-10-B, -D, -H와 stereochemistry가 같다는 것이 확인되었다. C-12 ~ C-15의 chemical shift 값들은 거의 동일하였기 때문에 C-14 비대칭 탄소중심의 stereochemistry는 모든 solandelactone들에 대해서 같다고 생각된다. 그러므로 화합물 91-10-A, -C, -G의 절대배열은 7*R*,8*R*,10*R*,11*S*,14*S*이며 91-10-B, -D, -H은 7*R*,8*R*,10*R*,11*R*,14*S*인 것으로 판단된다(Fig. 3-2).

마지막으로 대사물질 solandelactone I(91-10-I)가 oil 형태로 분리되었으며 이 물질의 분

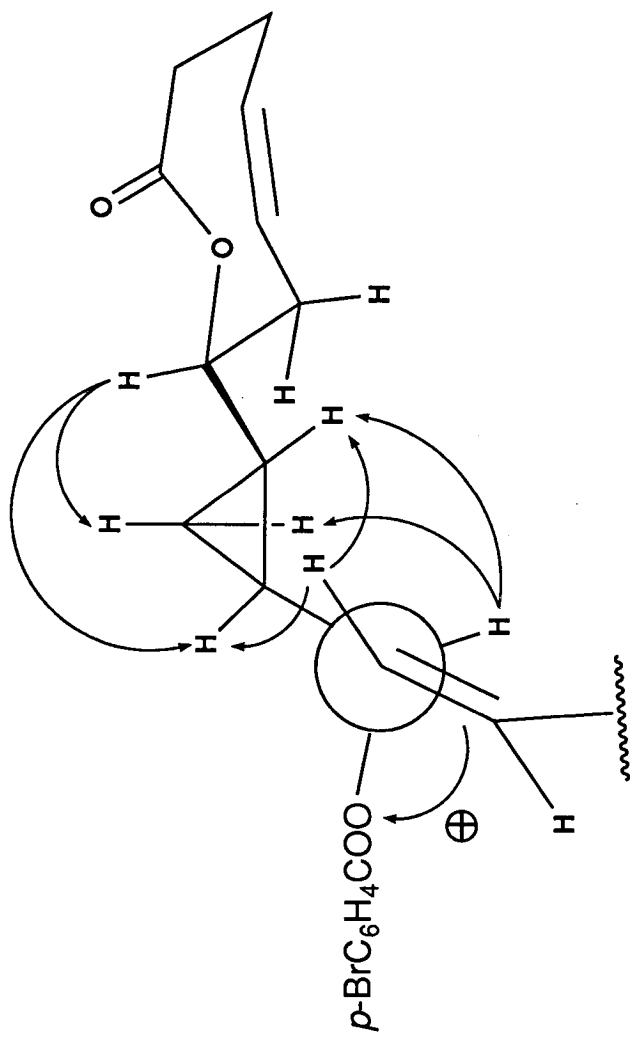


Fig. 3-5. Newman projection of conformation of 91-10-S based on NOESY experiments and CD analysis.

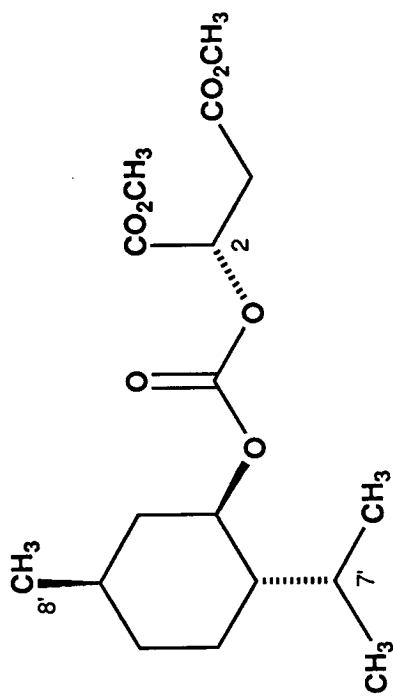


Fig. 3-6. 2S-(-)-Dimethyl-menthoxyacrylate (DMC) chloride.

자식은 고분별능 질량분석 및 ^{13}C NMR 데이터에 의하여 $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 로 결정되었다(Fig. 3-43). NMR 데이터 분석에 의하여 화합물 91-10-I 역시 다른 solandelactone과 마찬가지로 8각형 고리와 cyclopropyl ring을 가지고 있는 것이 확인되었다(Fig. 3-42, 3-45). 하지만 ^1H COSY 실험에서 δ 1.41(1H, m) ppm에 나타난 H-10 수소가 δ 5.37(1H, dd, $J = 15.1$ and 8.3 Hz)에 나타난 olefinic proton과 correlation을 보여 주었다(Fig. 3-44). 지금까지 화합물 91-10-A ~ -H에서는 이 H-10 수소가 hydroxyl기를 가진 methine proton 사이에서 correlation이 발견되었다. 이 물질의 전체적인 구조는 ^1H COSY와 HMQC에 의하여 결정되었으며 C-11과 C-16에 이중결합, C-13과 C-14에 hydroxyl group 그리고 cyclopropyl ring을 가진 C_{22} 지방산 락톤으로 결정되었다(Fig. 3-44, 3-45). 이 물질에 존재하는 두 개의 이중결합의 geometry는 coupling constant를 측정된 결과 각각 11E와 16Z로 확인되었으며 유사한 방법으로 cyclopropyl ring의 geometry도 trans($J_{8,9} = 8.3, 5.4$ Hz; $J_{9,10} = 8.3, 5.4$ Hz)로 결정되었다. 이 물질의 입체화학적 구조를 결정하기 위하여 H-7 수소를 irradiation 하였더니 H-10 수소에 대한 중대한 nOe enhancement가 관측되었으므로 lactone-cyclopropyl part에 대한 상대배열은 $7R^*, 8R^*, 10R^*$ 임이 분명하였다(Fig. 3-2). 유사한 oxylipin들(constanolactones E와 F)과 NMR 데이터를 비교한 결과 C-13에 있는 탄소와 수소의 chemical shift 값이 각각 δ 75.10과 3.92이었으며 C-14의 경우에는 74.29와 3.49이었다. 이 값은 erythro diol($11S^*, 12S^*$)인 constanolactone F(C-11에 대해서 δ 75.13과 3.91; C-12에 대해서는 δ 74.20과 3.49)와 거의 동일하였다(Nagle and Gerwick, 1994). 하지만 화합물 91-10-I의 epimer에 해당하는 threo diol이 분리되지 않았기 때문에 이 비대칭 탄소중심들의 배열은 임의적인 것으로 남는다.

Cyclopropyl과 lactone ring을 포함하는 oxylipin들은 여러 종류의 해양 무척추동물과 해조류로부터 분리되어 구조가 결정되었으며 그 중에서 해면 *Halichodria okadai*로부터 분리된 halicholactone과 neohalicholactone 그리고 이미 앞에서 언급된 constanolactones A와 B가 합성되었다(Higgs and Mulheirn, 1981; Baertschi *et al*, 1989; Niwa *et al*, 1989; Ojika *et al*, 1990; Gerwick, 1993; Nagle and Gerwick, 1990; 1994; Proteau *et al*, 1994; Kigoshi *et al*, 1991; Critcher *et al*, 1995; White and Jensen, 1993; 1995). 뿐만 아니라 이들에 대한 생합성적 경로에 대해서도 제시되었다(Brash *et al*, 1987; Brash, 1989; Baertschi *et al*, 1989). 하지만 우리 연구팀에서 분리한 solandelactone들은 지금까지 분리된 모든 oxylipin들이 eicosanoid 선구물질로부터 유도된 linear C_{20} 골격을 가지고 있는 반면에 docosahexenoic acid(DHA)나 관련된 docosanoid로부터 유도된 것으로 여겨 지는 C_{22} 탄소골격들을 가지고 있다.

Solandelactone들의 생합성적 경로는 constanolactone들에 대해 제시된 것들과 대단히 유사한 것으로 생각된다(Gerwick, 1993; Nagle and Gerwick, 1994) (Fig. 3-7). 먼저 polyunsaturated docosanoid fatty acid에 lipxygenase에 의한 산화가 일어나 hydroperoxy acid를 형성하고 이 hydroperoxy acid는 다시 epoxy-cation이나 epoxy-alcohol로 바뀐다. 이 epoxy-cation을 안정화 하기 위하여 lactone과 cyclopropane ring이 형성된 후에 가수분해에 의하여 epoxide ring이 열리면서 solandelactone들이 생성된다. C-11에서 alcohol epimer들이 생성

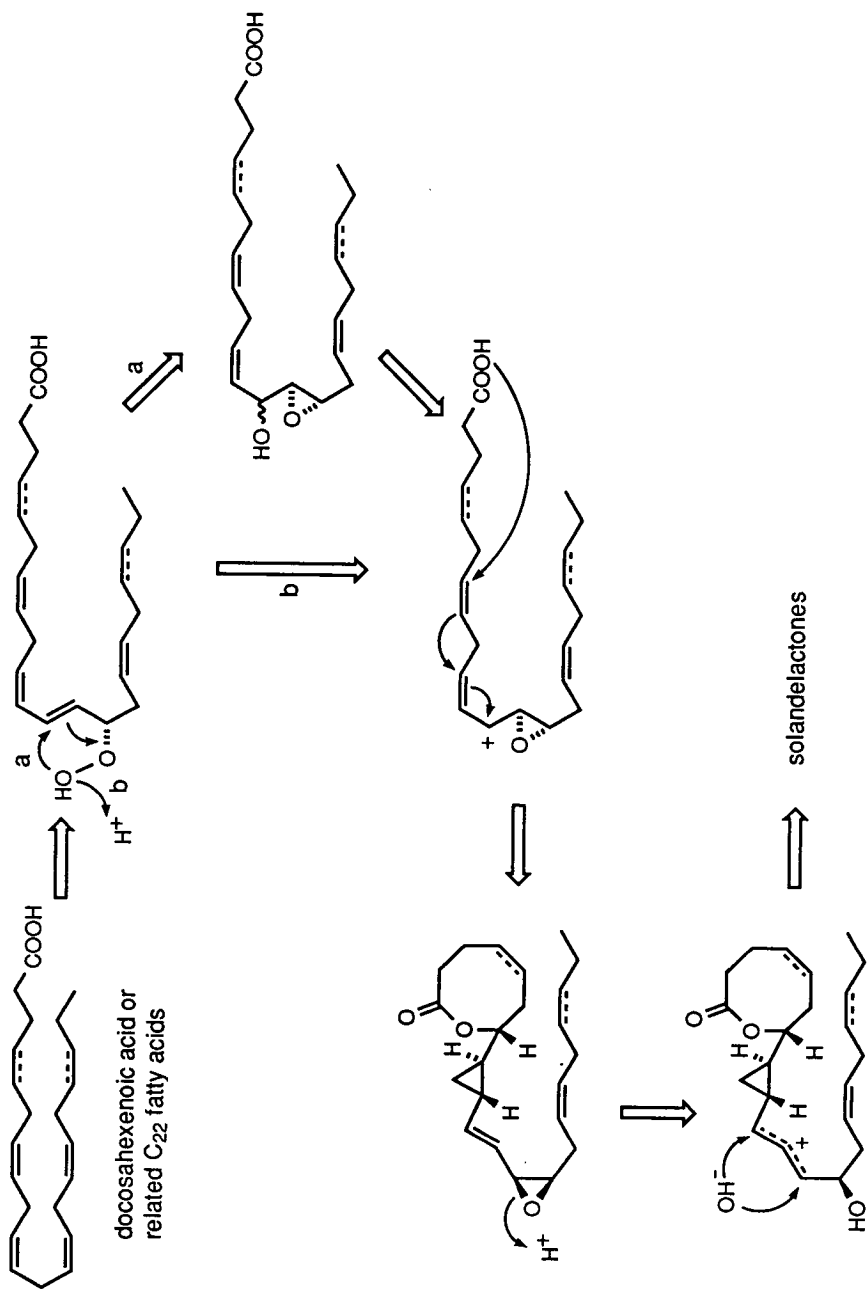


Fig. 3-7. Proposed biosynthetic pathway of solandelactones.

되는 것은 가수분해 과정이 비효소과정에 의하여 일어나기 때문인 것으로 여겨진다. Solandelactone I는 동일하게 ring이 열린 뒤에 C-13에서 가수분해가 일어난 것으로 판단되며 예상된 13-epimer는 이 일에서 발견되지 않았다.

지금까지 분리된 cyclopropyl ring을 포함하는 oxylipin들은 5-lipoxygenase나 PLA₂를 억제하는 활성도를 보이는 것으로 보고되었다(Niwa *et al*, 1989; Ojika, 1990). 이물질들과 prostaglandin의 유사한 생합성적 기원을 고려할 때 arachidonic acid cascade에 참여하는 효소에 이런 생리활성도를 가진다는 것은 어쩌면 당연하다고 생각된다. 하지만 solandelactone들은 이런 활성도를 전혀 나타내지 않았다. 이것은 아마 탄소골격에 탄소 2개가 추가적으로 존재하기 때문인 것으로 여겨진다. 하지만 solandelactone C(3), D(4), G(7)는 100 µg/ml의 농도에서 Farnesyl Protein Transferase를 각각 69, 89, 61%로 억제하였다.

3. 3. 실험방법

3. 3. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속크로마토그래피

Hydroid *Solanderia secunda*의 채집은 서귀포 근해 수심 25-30 m에서 2회('91년 1월, 7월) 및 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 1회('91년 10월) SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 웅달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 5 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기조추출물의 양은 10.7 g이 얻어 졌다.

이 조추출물을 진공 silica flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(5% ethylacetate/n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), acetone, methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 18개의 분액(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정된 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-12(55% ethylacetate/n-hexane: 100 mg), fx-13(60% ethylacetate/ n-hexane: 70 mg), fx-14(65% ethylacetate/n-hexane: 170 mg), fx-15(70% ethylacetate/ n-hexane: 140 mg) 및 fx-16(100% ethylacetate: 130 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

3. 3. 2. Solandelactone A(91-10-A)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-13(70 mg), -14(170 mg), -15(150 mg) 및 -16(130 mg)을 각각 42%나 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI

detector)로 분리하면 retention time 26.5 분(2 ml/min)과 33.6 분(2.5 ml/min)에 대사물질 91-10-A의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 22.4 mg(조추출물의 0.22 %)이었다.

91-10-A: oil; $[\alpha]_D^{25} +0.5^\circ$ (c 0.8, MeOH); HRDCIMS:(M+H)⁺ m/z observed 365.2687, calculated 365.2692; LRMS: m/z (relative intensity) 365(5), 347(60), 329(53), 235(48), 217(33), 199(16), 191(10), 171(14), 95(33), 55(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2870, 1730, 1460, 1240, 1130, 1050 cm^{-1} ; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.78(2H, m, H-12, H-13), 5.59(1H, dtt, $J = 10.8, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-17), 5.37(1H, dtt, $J = 10.8, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-16), 4.18(1H, dt, $J = 4.4$ and 6.4 Hz, H-14), 4.09(1H, dt, $J = 6.4$ and 7.8 Hz, H-7), 3.64(1H, dd, $J = 7.8$ and 3.4 Hz, H-11), 2.44(2H, m, H-2), 2.32(2H, m, H-15), 2.05(2H, br dt, $J = 6.8$ and 6.8 Hz, H-18), 1.85(4H, m, H-3, H-6), 1.68(1H, m, H-4), 1.53(3H, m, H-5, H-6), 1.34(2H, m, H-19), 1.28(4H, m, H-20, H-21), 1.15(1H, m, H-8), 0.98(1H, m, H-10), 0.88(3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-22), 0.68(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.57(C), 134.01(CH), 133.16(CH), 131.67(CH), 124.03(CH), 81.47(CH), 74.60(CH), 71.42(CH), 37.05(CH₂), 35.30(CH₂), 32.66(CH₂), 31.49(CH₂), 29.27(CH₂), 29.02(CH₂), 27.43(CH₂), 26.44(CH₂), 24.14(CH₂), 23.04(CH), 22.54(CH₂), 21.43(CH), 14.05(CH₃), 7.88(CH₂).

3. 3. 3. Solandelactone B(91-10-B)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-14(170 mg), fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector)로 분리하면 retention time 29.0 분(2.5 ml/min)에 대사물질 91-10-B의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 19.5 mg(조추출물의 0.19 %)이었다.

91-10-B: oil; $[\alpha]_D^{25} +6.5^\circ$ (c 0.8, MeOH); HRDCIMS:(M+H)⁺ m/z observed 365.2690, calculated 365.2692; LRMS: m/z (relative intensity) 365(13), 349(18), 347(100), 329(73), 235(44), 217(24), 199(12), 189(10), 167(11), 137(25), 95(30), 55(79); IR(KBr) 3400, 2930, 2850, 1730, 1450, 1240, 1130, 1060 cm^{-1} ; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.75(2H, m, H-12, H-13), 5.57(1H, dtt, $J = 10.7, 7.1,$ and 1.5 Hz, H-17), 5.37(1H, dtt, $J = 10.7, 7.1,$ and 1.5 Hz, H-16), 4.16(1H, dt, $J = 3.9$ and 6.3 Hz, H-14), 4.05(1H, dt, $J = 6.4$ and 6.8 Hz, H-7), 3.66(1H, dd, $J = 7.8$ and 4.9 Hz, H-11), 2.43(2H, m, H-2), 2.34(1H, ddd, $J = 14.6, 7.8,$ and 6.3 Hz, H-15), 2.28(1H, ddd, $J = 14.6, 7.1,$ and 6.3 Hz, H-15), 2.05(2H, br dt, $J = 7.3$ and 7.3 Hz, H-18), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.70(2H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.36(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.05(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.89(3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-22), 0.71(2H, m, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.55(C), 133.92(CH), 133.58(CH), 131.64(CH),

124.04(CH), 81.58(CH), 74.74(CH), 71.56(CH), 37.11(CH₂), 35.32(CH₂), 32.74(CH₂), 31.49(CH₂), 29.26(CH₂), 29.07(CH₂), 27.43(CH₂), 26.49(CH₂), 24.16(CH₂), 23.22(CH), 22.54(CH₂), 20.46(CH), 14.04(CH₃), 8.96(CH₂).

3. 3. 4. Solandelactone C(91-10-C)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-14(170 mg), fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector)로 분리하면 retention time 18.5 분(2.5 ml/min)에 대사물질 91-10-C의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 4.1 mg(조추출물의 0.04 %)이었다.

91-10-C: oil; $[\alpha]_D^{25} +2.9^\circ$ (c 0.2, MeOH); HRDCIMS:(M+NH₄)⁺ m/z observed 380.2785, calculated 380.2801; LRMS: m/z (relative intensity) 380(2), 214(25), 197(16), 141(11), 132(10), 125(14), 115(24), 81(27), 45(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1735, 1360, 1250, 1050, 990 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.81(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.0 Hz, H-13), 5.77(1H, dd, $J = 15.6$ and 4.4 Hz, H-12), 5.57(1H, dtt, $J = 11.2, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-19), 5.41(2H, m, H-16, H-20), 5.30(1H, dtt, $J = 10.7, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-17), 4.20(1H, dt, $J = 3.9$ and 6.6 Hz, H-14), 4.09(1H, dt, $J = 6.4$ and 7.6 Hz, H-7), 3.65(1H, dd, $J = 7.6$ and 4.4 Hz, H-11), 2.81(2H, dd, $J = 7.3$ and 7.3 Hz, H-18), 2.44(2H, m, H-2), 2.36(2H, m, H-15), 2.07(2H, br dq, $J = 7.6$ and 7.6 Hz, H-21), 1.85(4H, m, H-3, H-6), 1.69(2H, m, H-4), 1.55(2H, m, H-5), 1.16(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.98(3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-22), 0.68(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.55(C), 133.07(CH), 132.29(CH), 131.92(CH), 131.80(CH), 126.66(CH), 124.44(CH), 81.46(CH), 74.57(CH), 71.37(CH), 37.07(CH₂), 35.30(CH₂), 32.70(CH₂), 29.05(CH₂), 26.47(CH₂), 25.73(CH₂), 24.17(CH₂), 23.03(CH), 21.44(CH), 20.60(CH₂), 14.23(CH₃), 7.87(CH₂).

3. 3. 5. Solandelactone D(91-10-D)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector)로 분리하면 retention time 20 분(2.5 ml/min)에 대사물질 91-10-D의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 4.9 mg(조추출물의 0.05 %)이었다.

91-10-D: oil; $[\alpha]_D^{25} +5.7^\circ$ (c 0.2, MeOH); HRDCIMS:(M+NH₄)⁺ m/z observed 380.2817, calculated 380.2801; LRMS: m/z (relative intensity) 380(19), 306(5), 214(28), 132(19), 97(16),

59(41), 44(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1735, 1460, 1250, 1130, 1050 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.76(1H, m, H-13), 5.76(1H, m, H-12), 5.56(1H, dtt, $J = 12.2, 7.5,$ and 1.4 Hz, H-19), 5.41(2H, m, H-16, H-20), 5.30(1H, dtt, $J = 12.2, 7.5,$ and 1.4 Hz, H-17), 4.19(1H, dt, $J = 4.2$ and 6.0 Hz, H-14), 4.05(1H, dt, $J = 6.6$ and 7.5 Hz, H-7), 3.66(1H, dd, $J = 8.0$ and 4.5 Hz, H-11), 2.81(2H, dd, $J = 7.3$ and 7.3 Hz, H-18), 2.43(2H, m, H-2), 2.35(2H, m, H-15), 2.07(2H, br dq, $J = 7.0$ and 7.0 Hz, H-21), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.69(2H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.06(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.98(3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-22), 0.71(2H, m, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.56(C), 133.47(CH), 132.32(CH), 131.90(CH), 131.73(CH), 126.60(CH), 124.41(CH), 81.54(CH), 74.71(CH), 71.50(CH), 37.10(CH_2), 35.30(CH_2), 32.75(CH_2), 29.07(CH_2), 26.49(CH_2), 25.73(CH_2), 24.16(CH_2), 23.21(CH), 21.44(CH), 20.47(CH_2), 14.24(CH_3), 8.94(CH_2).

3. 3. 6. Solandelactone E(91-10-E)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C_{18} filter (Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출 용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C_{18} column, RI detector, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 47.0 분에 대사물질 91-10-E의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 35.1 mg(조추출물의 0.35 %)이었다.

91-10-E: oil; $[\alpha]_D^{25} +2.0^\circ$ (c 0.7, MeOH); HRDCIMS:($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$ m/z observed 380.2785, calculated 380.2801; LRMS: m/z (relative intensity) 380(17), 362(20), 345(61), 327(32), 233(10), 212(32), 182(13), 128(28), 96(26), 44(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1745, 1330, 1220, 1050, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.78(3H, m, H-4, H-12, H-13), 5.76(1H, m, H-5), 5.58(1H, br dt, $J = 11.1$ and 7.3 Hz, H-17), 5.38(1H, br dt, $J = 11.1$ and 6.8 Hz, H-16), 4.18(1H, dt, $J = 5.5$ and 6.8 Hz, H-14), 4.05(1H, ddd, $J = 10.3, 7.3,$ and 1.0 Hz, H-7), 3.66(1H, br dd, $J = 7.3$ and 4.4 Hz, H-11), 2.86(1H, m, H-3), 2.73(1H, ddd, $J = 13.2, 5.9,$ and 2.9 Hz, H-2), 2.63(1H, ddd, $J = 14.2, 10.5,$ and 6.4 Hz, H-6), 2.30(1H, m, H-2), 2.32(2H, m, H-15), 2.26(1H, ddd, $J = 14.2, 7.8,$ and 1.5 Hz, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.05(2H, dt, $J = 7.3$ and 7.3 Hz, H-18), 1.36(2H, m, H-19), 1.28(4H, m, H-20, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(2H, m, H-10), 0.89(3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 4.9 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.3 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.99(C, C-1), 133.09(CH, C-12), 133.85(CH, C-17), 132.72(CH, C-13), 131.73(CH, C-4), 128.11(CH, C-5), 124.08(CH, C-16), 80.87(CH, C-7), 74.36(CH, C-11), 71.42(CH, C-14), 37.69(CH_2 , C-2), 35.26(CH_2 , C-3), 34.21(CH_2 , C-6), 31.47(CH_2 , C-20), 29.24(CH_2 , C-19), 27.40(CH_2 , C-18), 24.38(CH_2 , C-3), 23.31(CH, C-10), 22.51(CH_2 , C-21), 20.56(CH, C-8), 14.02(CH_3 , C-22),

7.96(CH₂, C-9).

3. 3. 7. Solandelactone F(91-10-F)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-12(100 mg), -13(70 mg) 및 -14(170 mg)를 각각 42% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter (Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 28.8 분에 대사물질 91-10-F의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 42.0 mg(조추출물의 0.42 %)이었다.

91-10-F: oil; $[\alpha]_D^{25} +3.0^\circ$ (c 1.0, MeOH); HRDCIMS:(M+NH₄)⁺ *m/z* observed 380.2812, calculated 380.2801; LRMS: *m/z*(relative intensity) 380(13), 362(13), 345(100), 327(51), 233(15), 107(10), 96(15), 81(26), 55(16); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1740, 1330, 1220, 1060, 970 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.79(3H, m, H-4, H-12, H-13), 5.73(1H, m, H-5), 5.58(1H, br dt, *J* = 11.0 and 7.3 Hz, H-17), 5.37(1H, br dt, *J* = 11.0 and 7.1 Hz, H-16), 4.17(1H, dt, *J* = 5.3 and 6.8 Hz, H-14), 4.01(1H, ddd, *J* = 10.3, 8.1, and 1.7 Hz, H-7), 3.67(1H, br dd, *J* = 6.3 and 4.9 Hz, H-11), 2.84(1H, m, H-3), 2.73(1H, ddd, *J* = 13.2, 5.9, and 2.9 Hz, H-2), 2.57(1H, ddd, *J* = 14.0, 10.3, and 6.4 Hz, H-6), 2.30(1H, m, H-2), 2.33(2H, m, H-15), 2.19(1H, ddd, *J* = 14.0, 8.1, and 1.7 Hz, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.04(2H, dt, *J* = 7.3 and 7.3 Hz, H-18), 1.35(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.02(2H, m, H-8, H-10), 0.89(3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-22), 0.78(1H, ddd, *J* = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.70(1H, ddd, *J* = 8.4, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.88(C, C-1), 133.91(CH, C-12), 133.62(CH, C-17), 132.80(CH, C-13), 131.70(CH, C-4), 127.99(CH, C-5), 124.02(CH, C-16), 80.76(CH, C-7), 74.74(CH, C-11), 71.57(CH, C-14), 37.69(CH₂, C-2), 35.29(CH₂, C-15), 34.30(CH₂, C-6), 31.50(CH₂, C-19), 29.26(CH₂, C-20), 27.42(CH₂, C-18), 24.41(CH₂, C-3), 23.49(CH, C-8), 22.53(CH₂, C-21), 19.73(CH, C-10), 14.04(CH₃, C-22), 9.02(CH₂, C-9).

3. 3. 8. Solandelactone G(91-10-G)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 32.5 분에 대사물질 91-10-G의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 19.2 mg(조추출물의 0.19 %)이었다.

91-10-G: oil; $[\alpha]_D^{25} +3.7^\circ$ (c 0.8, MeOH); HRDCIMS:(M-H)⁺ *m/z* observed 359.2217, calculated 380.2222; LRMS: *m/z*(relative intensity) 359(3), 343(5), 268(9), 233(15), 228(38),

212(59), 149(14), 132(31), 96(59), 44(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2870, 1740, 1450, 1380, 1250, 1040 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.79(3H, m, H-4, H-12, H-13), 5.74(1H, m, H-5), 5.57(1H, dtt, $J = 10.7, 6.8, \text{ and } 1.5$ Hz, H-17), 5.41(2H, m, H-16, H-20), 5.30(1H, dtt, $J = 10.7, 6.8, \text{ and } 1.5$ Hz, H-17), 4.20(1H, dt, $J = 5.9 \text{ and } 4.9$ Hz, H-14), 4.01(1H, ddd, $J = 10.0, 8.3, \text{ and } 1.9$ Hz, H-7), 3.67(1H, dd, $J = 7.8 \text{ and } 4.9$ Hz, H-11), 2.85(1H, m, H-3), 2.81(2H, dd, $J = 7.1 \text{ and } 7.1$ Hz, H-18), 2.74(1H, ddd, $J = 13.7, 5.9, \text{ and } 2.9$ Hz, H-2), 2.57(1H, ddd, $J = 14.0, 10.3, \text{ and } 6.4$ Hz, H-6), 2.33(2H, m, H-15), 2.33(1H, ddd, $J = 13.7, 4.9, \text{ and } 1.5$ Hz, H-2), 2.26(1H, ddd, $J = 14.0, 7.8, \text{ and } 1.5$ Hz, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.07(2H, br dq, $J = 7.3 \text{ and } 7.3$ Hz, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(1H, m, H-6), 0.98(3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, $J = 8.8, 5.1, \text{ and } 5.1$ Hz, H-9), 0.60 (1H, ddd, $J = 8.8, 5.1, \text{ and } 5.1$ Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.90(C), 133.03(CH), 132.71(CH), 132.24(CH), 131.82(CH x 2), 128.10(CH), 126.66(CH), 124.47(CH), 80.79(CH), 74.37(CH), 71.40(CH), 37.71(CH_2), 35.30(CH_2), 34.23(CH_2), 25.74(CH_2), 24.42(CH_2), 23.32(CH), 20.60(CH, CH_2), 14.23(CH_3), 7.97(CH_2).

3. 3. 9. Solandelactone H(91-10-H)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-12(100 mg), -13(70 mg) 및 -14(170 mg)를 각각 42% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C_{18} filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C_{18} column, RI detector, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 19.8 분에 대사물질 91-10-H의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 16.8 mg(조추출물의 0.17 %)이었다.

91-10-H: oil: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +2.4^\circ$ (c 0.5, MeOH); HRDCIMS:(M-H) $^+$ m/z observed 359.2239, calculated 380.2222; LRMS: m/z (relative intensity) 359(1), 268(1), 233(7), 149(11), 137(16), 126(24), 109(25), 97(37), 44(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2870, 1730, 1450, 1380, 1250, 1050, 990 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.79(3H, m, H-4, H-12, H-13), 5.74(1H, m, H-5), 5.57(1H, dtt, $J = 10.7, 7.3, \text{ and } 1.5$ Hz, H-19), 5.41(2H, m, H-16, H-20), 5.29(1H, dtt, $J = 10.8, 7.3, \text{ and } 1.5$ Hz, H-17), 4.19(1H, dt, $J = 6.8 \text{ and } 5.1$ Hz, H-14), 4.01(1H, ddd, $J = 10.2, 7.8, \text{ and } 1.9$ Hz, H-7), 3.67(1H, dd, $J = 6.8 \text{ and } 4.9$ Hz, H-11), 2.85(1H, m, H-3), 2.81(2H, dd, $J = 7.3 \text{ and } 7.3$ Hz, H-18), 2.73(1H, ddd, $J = 13.2, 5.9, \text{ and } 2.9$ Hz, H-2), 2.58(1H, dddd, $J = 14.0, 10.2, 6.8, \text{ and } 1.3$ Hz, H-6), 2.36(2H, m, H-15), 2.30(1H, ddd, $J = 13.2, 11.7, \text{ and } 4.9$ Hz, H-2), 2.19(1H, ddd, $J = 14.0, 8.0, \text{ and } 1.9$ Hz, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.07(2H, br dq, $J = 7.3 \text{ and } 7.6$ Hz, H-21), 1.03(2H, m, H-8, H-10), 0.98(3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-22), 0.78(1H, ddd, $J = 8.1, 5.4, \text{ and } 5.3$ Hz, H-9), 0.70 (1H, ddd, $J = 8.1, 5.4, \text{ and } 5.4$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.84(C), 133.50(CH), 132.83(CH), 132.30(CH), 131.93(CH), 131.76(CH),

127.99(CH), 126.60(CH), 124.39(CH), 80.70(CH), 74.69(CH), 71.48(CH), 37.70(CH₂), 35.29(CH₂), 34.31(CH₂), 25.73(CH₂), 24.42(CH₂), 23.49(CH), 20.59(CH₂), 19.76(CH), 14.24(CH₃), 8.99(CH₂).

3. 3. 10. Solandelactone I(91-10-I) 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 44.6 분에 대사물질 91-10-I의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 9.8 mg(조추출물의 0.10 %)이었다.

91-10-I: oil; $[\alpha]_D^{25}$ -37.7°(c 0.3, MeOH); HRDCIMS:(M+NH₄)⁺ *m/z* observed 382.2973, calculated 382.2957; LRMS: *m/z*(relative intensity) 382(46), 347(11), 242(18), 223(16), 158(60), 126(14), 96(19), 81(22), 45(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1730, 1240, 1050, 970 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.57(1H, dtt, *J* = 9.8, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.56(1H, dd, *J* = 15.1 and 8.3 Hz, H-12), 5.42(1H, dtt, *J* = 9.8, 7.8, and 1.5 Hz, H-16), 5.37(1H, dd, *J* = 15.1 and 8.3 Hz, H-11), 4.12(1H, dt, *J* = 6.3 and 7.6 Hz, H-7), 3.92(1H, dd, *J* = 6.3 and 6.3 Hz, H-13), 3.49(1H, ddd, *J* = 7.8, 6.0, and 4.8 Hz, H-14), 2.44(2H, m, H-2), 2.25(2H, m, H-15), 2.04(2H, dt, *J* = 6.8 and 7.1 Hz, H-18), 1.87(2H, m, H-3), 1.82(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.54(2H, m, H-5), 1.41(1H, m, H-10), 1.35(2H, m, H-19), 1.30(2H, m, H-20), 1.27(2H, m, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(1H, m), 0.89(1H, ddd, *J* = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.89(3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-22), 0.71(1H, ddd, *J* = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.62(C), 133.62(CH), 133.55(CH), 127.60(CH), 124.42(CH), 81.29(CH), 75.10(CH), 74.29(CH), 37.13(CH₂), 32.69(CH₂), 31.50(CH₂), 31.07(CH₂), 29.24(CH₂), 29.06(CH₂), 27.36(CH₂), 26.46(CH₂), 24.86(CH), 24.15(CH₂), 22.62(CH₂), 19.24(CH), 14.03(CH₃), 12.16(CH₂).

3. 3. 11. Solandelactone A diacetate(91-10-J)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-A 1.5 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 25.4분에서 diacetate 91-10-J이 1.3 mg 얻어 졌다.

91-10-J: oil; HRDCIMS:(M+H)⁺ *m/z* observed 449.2898, calculated 449.2903; LRMS:

m/z (relative intensity) 449(14), 389(100), 337(27), 329(37), 235(22), 217(18), 137(10), 109(11), 81(31); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.71(1H, m, H-13), 5.69(1H, m, H-12), 5.51(1H, dtt, J = 11.2, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.28(1H, dtt, J = 11.2, 7.3, and 1.5 Hz, H-16), 5.27(1H, m, H-14), 4.83(1H, ddd, J = 8.3, 3.2, and 1.5 Hz, H-11), 4.05(1H, dt, J = 5.4 and 8.1 Hz, H-7), 2.43(3H, m, H-2, H-15), 2.34(1H, m, H-15), 2.07(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, br dt, J = 6.4 and 7.8 Hz, H-18), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.21(1H, m, H-10), 1.04(1H, m, H-8), 0.89(3H, t, J = 7.1 Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.56(C), 170.12(C), 170.12(C), 133.33(CH), 130.57(CH), 129.50(CH), 123.17(CH), 81.16(CH), 75.73(CH), 73.09(CH), 36.97(CH_2), 32.89(CH_2), 32.28(CH_2), 31.51(CH_2), 29.21(CH_2), 29.14(CH_2), 27.39(CH_2), 26.57(CH_2), 24.19(CH_2), 22.57(CH_2), 21.69(CH), 21.25(OCH_3), 21.21(OCH_3), 20.52(CH), 14.07(CH_3), 8.39(CH_2).

3. 3. 12. Solandelactone B diacetate(91-10-K)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-B 2.0 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C_{18} reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 24.0분에서 diacetate 91-10-K이 1.6 mg 얻어 졌다.

91-10-K: oil; HRDCIMS:($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$ m/z observed 466.3151, calculated 466.3169; LRMS: m/z (relative intensity) 466(24), 389(9), 337(2), 214(5), 126(6), 98(11), 86(10), 77(16), 60(49), 45(100); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.68(1H, dd, J = 15.6 and 5.4 Hz, H-13), 5.64(1H, dd, J = 15.6 and 5.4 Hz, H-12), 5.50(1H, dtt, J = 10.7, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.28(1H, dtt, J = 10.7, 7.3, and 1.5 Hz, H-16), 5.25(1H, m, H-14), 4.88(1H, dd, J = 7.3 and 5.4 Hz, H-11), 4.06(1H, dt, J = 6.8 and 7.1 Hz, H-7), 2.42(2H, m, H-2, H-15), 2.41(1H, m, H-15), 2.32(1H, m, H-15), 2.06(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, br dt, J = 6.8 and 7.3 Hz, H-18), 1.78(2H, br dt, J = 5.9 and 6.1 Hz, H-6), 1.69(1H, m, H-4), 1.55(1H, m, H-4), 1.52(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.04(2H, m, H-8, H-10), 0.89(3H, t, J = 6.8 Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.70(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.51(C), 170.11(C), 170.09(C), 133.35(CH), 130.92(CH), 129.35(CH), 123.18(CH), 81.22(CH), 75.46(CH), 73.11(CH); 37.17(CH_2), 32.86(CH_2),

127.99(CH), 126.60(CH), 124.39(CH), 80.70(CH), 74.69(CH), 71.48(CH), 37.70(CH₂), 35.29(CH₂), 34.31(CH₂), 25.73(CH₂), 24.42(CH₂), 23.49(CH), 20.59(CH₂), 19.76(CH), 14.24(CH₃), 8.99(CH₂).

3. 3. 10. Solandelactone I(91-10-I) 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 44.6 분에 대사물질 91-10-I의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 9.8 mg(조추출물의 0.10 %)이었다.

91-10-I: oil; $[\alpha]_D^{25}$ -37.7°(c 0.3, MeOH); HRDCIMS:(M+NH₄)⁺ *m/z* observed 382.2973, calculated 382.2957; LRMS: *m/z*(relative intensity) 382(46), 347(11), 242(18), 223(16), 158(60), 126(14), 96(19), 81(22), 45(100); IR(KBr) 3400, 2930, 2860, 1730, 1240, 1050, 970 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.57(1H, dtt, *J* = 9.8, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.56(1H, dd, *J* = 15.1 and 8.3 Hz, H-12), 5.42(1H, dtt, *J* = 9.8, 7.8, and 1.5 Hz, H-16), 5.37(1H, dd, *J* = 15.1 and 8.3 Hz, H-11), 4.12(1H, dt, *J* = 6.3 and 7.6 Hz, H-7), 3.92(1H, dd, *J* = 6.3 and 6.3 Hz, H-13), 3.49(1H, ddd, *J* = 7.8, 6.0, and 4.8 Hz, H-14), 2.44(2H, m, H-2), 2.25(2H, m, H-15), 2.04(2H, dt, *J* = 6.8 and 7.1 Hz, H-18), 1.87(2H, m, H-3), 1.82(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.54(2H, m, H-5), 1.41(1H, m, H-10), 1.35(2H, m, H-19), 1.30(2H, m, H-20), 1.27(2H, m, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(1H, m), 0.89(1H, ddd, *J* = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.89(3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-22), 0.71(1H, ddd, *J* = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.62(C), 133.62(CH), 133.55(CH), 127.60(CH), 124.42(CH), 81.29(CH), 75.10(CH), 74.29(CH), 37.13(CH₂), 32.69(CH₂), 31.50(CH₂), 31.07(CH₂), 29.24(CH₂), 29.06(CH₂), 27.36(CH₂), 26.46(CH₂), 24.86(CH), 24.15(CH₂), 22.62(CH₂), 19.24(CH), 14.03(CH₃), 12.16(CH₂).

3. 3. 11. Solandelactone A diacetate(91-10-J)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-A 1.5 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 25.4분에서 diacetate 91-10-J이 1.3 mg 얻어 졌다.

91-10-J: oil; HRDCIMS:(M+H)⁺ *m/z* observed 449.2898, calculated 449.2903; LRMS:

m/z (relative intensity) 449(14), 389(100), 337(27), 329(37), 235(22), 217(18), 137(10), 109(11), 81(31); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.71(1H, m, H-13), 5.69(1H, m, H-12), 5.51(1H, dtt, J = 11.2, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.28(1H, dtt, J = 11.2, 7.3, and 1.5 Hz, H-16), 5.27(1H, m, H-14), 4.83(1H, ddd, J = 8.3, 3.2, and 1.5 Hz, H-11), 4.05(1H, dt, J = 5.4 and 8.1 Hz, H-7), 2.43(3H, m, H-2, H-15), 2.34(1H, m, H-15), 2.07(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, br dt, J = 6.4 and 7.8 Hz, H-18), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.21(1H, m, H-10), 1.04(1H, m, H-8), 0.89(3H, t, J = 7.1 Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.56(C), 170.12(C), 170.12(C), 133.33(CH), 130.57(CH), 129.50(CH), 123.17(CH), 81.16(CH), 75.73(CH), 73.09(CH), 36.97(CH_2), 32.89(CH_2), 32.28(CH_2), 31.51(CH_2), 29.21(CH_2), 29.14(CH_2), 27.39(CH_2), 26.57(CH_2), 24.19(CH_2), 22.57(CH_2), 21.69(CH), 21.25(OCH_3), 21.21(OCH_3), 20.52(CH), 14.07(CH_3), 8.39(CH_2).

3. 3. 12. Solandelactone B diacetate(91-10-K)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-B 2.0 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C_{18} reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 24.0분에서 diacetate 91-10-K이 1.6 mg 얻어 졌다.

91-10-K: oil; HRDCIMS:($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$ m/z observed 466.3151, calculated 466.3169; LRMS: m/z (relative intensity) 466(24), 389(9), 337(2), 214(5), 126(6), 98(11), 86(10), 77(16), 60(49), 45(100); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.68(1H, dd, J = 15.6 and 5.4 Hz, H-13), 5.64(1H, dd, J = 15.6 and 5.4 Hz, H-12), 5.50(1H, dtt, J = 10.7, 7.3, and 1.5 Hz, H-17), 5.28(1H, dtt, J = 10.7, 7.3, and 1.5 Hz, H-16), 5.25(1H, m, H-14), 4.88(1H, dd, J = 7.3 and 5.4 Hz, H-11), 4.06(1H, dt, J = 6.8 and 7.1 Hz, H-7), 2.42(2H, m, H-2, H-15), 2.41(1H, m, H-15), 2.32(1H, m, H-15), 2.06(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, br dt, J = 6.8 and 7.3 Hz, H-18), 1.78(2H, br dt, J = 5.9 and 6.1 Hz, H-6), 1.69(1H, m, H-4), 1.55(1H, m, H-4), 1.52(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, H-21), 1.04(2H, m, H-8, H-10), 0.89(3H, t, J = 6.8 Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.70(1H, ddd, J = 8.3, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.51(C), 170.11(C), 170.09(C), 133.35(CH), 130.92(CH), 129.35(CH), 123.18(CH), 81.22(CH), 75.46(CH), 73.11(CH), 37.17(CH_2), 32.86(CH_2),

32.28(CH₂), 31.50(CH₂), 29.19(CH₂), 29.17(CH₂), 27.39(CH₂), 26.58(CH₂), 24.21(CH₂), 22.56(CH₂), 21.25(OCH₃), 21.23(OCH₃), 20.62(CH), 20.57(CH), 14.07(CH₃), 9.36(CH₂).

3. 3. 13. Solandelactone E diacetate(91-10-L)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-E 5.0 mg(13.8 μmol), acetic anhydride 0.2 ml, pyridine 0.3 ml를 넣고 2시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2 ml/min)로 분리한 결과 retention time 10분에서 diacetate 91-10-L이 6.0 mg(13.4 μmol, 수율 97%) 얻어 졌다.

91-10-L: oil; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.75(1H, m, H-4), 5.70(1H, m, H-5), 5.68(2H, m, H-12, H-13), 5.49(1H, br dt, *J* = 11.2 and 7.3 Hz, H-17), 5.27(1H, br dt, *J* = 11.2 and 7.1 Hz, H-16), 5.27(1H, m, H-14), 4.80(1H, dd, *J* = 8.6 and 2.6 Hz, H-11), 3.94(1H, ddd, *J* = 10.7, 8.1, and 1.7 Hz, H-7), 2.82(1H, m, H-3), 2.70(1H, ddd, *J* = 13.2, 5.9, and 2.9 Hz, H-2), 2.56(1H, ddd, *J* = 14.1, 10.3, and 6.4 Hz, H-6), 2.36(2H, m, H-15), 2.27(1H, ddd, *J* = 13.2, 11.7, and 4.9 Hz, H-2), 2.16(1H, ddd, *J* = 14.1, 7.8, and 1.5 Hz, H-6), 2.10(1H, m, H-3), 2.01(2H, q, *J* = 7.3 Hz, H-18), 2.05(3H, s, OAc), 2.04(3H, s, OAc), 1.32(2H, quin, *J* = 7.3 Hz, H-19), 1.27(4H, m, H-20, H-21), 1.18(1H, m, H-10), 1.03(1H, m, H-8), 0.87(3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-22), 0.78(1H, ddd, *J* = 8.8, 5.4, and 5.4 Hz, H-9), 0.60(1H, ddd, *J* = 8.8, 5.4, and 5.4 Hz, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.78(C, C-1), 170.07(C), 133.30(CH, C-17), 132.84(CH, C-4), 130.50(CH, C-12), 129.49(CH, C-13), 127.93(CH, C-5), 123.15(CH, H-16), 80.51(CH, C-7), 75.81(CH, C-11), 73.07(CH, C-14), 37.77(CH₂, C-2), 34.17(CH₂, C-6), 32.30(CH₂, C-15), 31.53(CH₂, C-20), 29.23(CH₂, C-19), 27.42(CH₂, C-18), 24.47(CH₂, C-3), 22.60(CH₂, C-21), 21.27(CH₃), 21.24(CH₃), 21.14(CH, C-10), 20.93(CH, C-8), 14.10(CH₃, C-22), 8.75(CH₂, C-9).

3. 3. 14. Solandelactone F diacetate(91-10-M)의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-F 7.0 mg(19.3 μmol), acetic anhydride 0.2 ml, pyridine 0.3 ml를 넣고 2시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2

ml/min)로 분리한 결과 retention time 30분에서 diacetate **91-10-M**이 7.8 mg(17.4 μ mol, 수율 91%) 얻어 졌다.

91-10-M: oil; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.76(1H, m, H-4), 5.72(1H, m, H-5), 5.66(2H, m, H-12, H-13), 5.48(1H, br dt, $J = 10.8$ and 6.6 Hz, H-17), 5.26(1H, br dt, $J = 10.8$ and 6.8 Hz, H-16), 5.24(1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-14), 4.84(1H, dd, $J = 7.8$ and 5.4 Hz, H-11), 3.97(1H, ddd, $J = 10.2$, 8.3 , and 1.5 Hz, H-7), 2.82(1H, m, H-3), 2.70(1H, ddd, $J = 13.2$, 6.3 , and 2.9 Hz, H-2), 2.54(1H, ddd, $J = 14.1$, 9.8 , and 6.4 Hz, H-6), 2.35(2H, m, H-15), 2.27(1H, ddd, $J = 13.2$, 11.7 , and 4.9 Hz, H-2), 2.14(1H, ddd, $J = 14.1$, 8.3 , and 1.5 Hz, H-6), 2.10(1H, m, H-3), 1.99(2H, q, $J = 6.6$ Hz, H-18), 2.05(3H, s, OAc), 2.03(3H, s, OAc), 1.32(2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-19), 1.27(4H, m, H-20, H-21), 1.05(1H, m, H-10), 0.99(1H, m, H-8), 0.87(3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-22), 0.74(1H, ddd, $J = 8.3$, 5.4 , and 5.4 Hz, H-9), 0.71(1H, ddd, $J = 8.3$, 5.4 , and 5.4 Hz, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.74(C, C-1), 170.12(C), 170.08(C), 133.36(CH, C-17), 132.87(CH, C-4), 130.50(CH, C-12), 129.49(CH, H-13), 127.91(CH, C-5), 123.16(CH, H-16), 80.42(CH, C-7), 75.55(CH, C-11), 73.07(CH, C-14), 37.70(CH_2 , C-2), 34.17(CH_2 , C-6), 32.26(CH_2 , C-15), 31.50(CH_2 , C-20), 29.19(CH_2 , C-19), 27.39(CH_2 , C-18), 24.43(CH_2 , C-3), 22.56(CH_2 , C-21), 21.25(CH_3), 21.21(CH_3), 20.87(CH, C-8), 19.97(CH, C-10), 14.07(CH_3 , C-22), 9.57(CH_2 , C-9).

3. 3. 15. Solandelactone E(**91-10-E**)의 *p*-bromobenzoylation

20 ml round-bottomed flask에 **91-10-E** 4.5 mg(12.4 μ mol)를 건조된 dichloromethane/pyridine(12.5:1, 10.8 ml)에 녹이고 *p*-bromobenzoyl chloride 37 mg(168.6 μ mol)을 조금씩 첨가시킨 후에 이를 동안 실온에서 교반시켰다. Rotavapor와 질소 기체를 이용하여 dichloromethane과 pyridine을 제거하였으며 남아 있는 잔류물로부터 원하는 물질을 NP-HPLC(YMC Silica normal phase column, 10 x 25 mm, RI detector, flow rate 2 ml/min, 30%(v/v) EtOAc in hexane)를 이용하여 분리하였다. Retention time 8 분에 bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(**91-10-N**), 6 mg(8.3 μ mol, 수율 66.7%), 16분에 11-(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(**91-10-O**)와 14-(*p*-bromobenzoyl)-solandelactone E(**91-10-P**)가 2.8 mg 얻어 졌다. **91-10-O**와 **-P**가 혼합물의 형태로 얻어졌기 때문에 다시 RP-HPLC로 순수하게 분리하였다(Sheido Capcell C_{18} reversed phase column, 10 x 25 mm, RI detector, flow rate 2 ml/min, 15%(v/v) Water/Acetonitrile). Retention time 38분에 **91-10-O**가 1.0 mg(1.8 μ mol, 수율 14.9%), 44 분에 **91-10-P**가 1.2 mg(2.2 μ mol, 수율 17.9%)이 얻어 졌다.

Bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(**91-10-N**): oil; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.88(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.87(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.57(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar),

7.56(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 5.87(2H, m, H-12, H-13), 5.73(1H, br dt, $J = 11.2$ and 6.6 Hz, H-4), 5.63(1H, $J = 11.2$ and 8.1 Hz, H-5), 5.53(1H, m, H-14), 5.48(1H, dt, $J = 11.2, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-16), 5.33(1H, dt, $J = 11.2, 7.1,$ and 1.5 Hz, H-17), 5.07(1H, dd, $J = 8.3$ and 2.4 Hz, H-11), 3.94(1H, ddd, $J = 10.3, 8.8,$ and 2.0 Hz, H-7), 2.81(1H, m, H-3), 2.68(1H, ddd, $J = 13.2, 5.9,$ and 2.9 Hz, H-2), 2.47(1H, m, H-6), 2.50(2H, m, H-15), 2.26(1H, ddd, $J = 13.2, 11.7,$ and 4.9 Hz, H-2), 2.09(1H, ddd, $J = 10.3, 8.1,$ and 2.0 Hz, H-6), 2.07(1H, m, H-3), 1.98(2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-18), 1.27(2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-19), 1.23(4H, m, H-20, H-21), 1.25(1H, m, H-8), 1.16(1H, m, H-10), 0.84(1H, ddd, $J = 8.8, 5.1,$ and 5.1 Hz, H-9), 0.84(3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-22), 0.69(1H, ddd, $J = 8.8, 5.1,$ and 5.1 Hz, H-9).

11-(*p*-Bromobenzoyl)solandelactone E(91-10-O): oil; UV(MeOH) λ_{\max} 243 nm(ϵ 19800); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.89(2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar), 7.58(2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar), 5.85(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.7 Hz, H-13), 5.81(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.4 Hz, H-12), 5.74(1H, m, H-4), 5.66(1H, m, H-5), 5.56(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-16), 5.33(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.8 Hz, H-17), 5.03(1H, dd, $J = 8.3$ and 5.4 Hz, H-11), 4.18(1H, q, $J = 5.7$ Hz, H-14), 3.95(1H, br dd, $J = 8.5$ and 8.5 Hz, H-7), 2.80(1H, m, H-3), 2.69(1H, ddd, $J = 13.2, 5.4,$ and 2.9 Hz, H-2), 2.51(1H, m, H-6), 2.28(2H, m, H-15), 2.28(1H, m, H-2), 2.12(1H, ddd, $J = 14.1, 8.3,$ and 1.5 Hz, H-6), 2.08(1H, m, H-3), 2.01(2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.32(2H, quin, $J = 7.1$ Hz, H-19), 1.26(4H, m, H-20, H-21), 1.25(1H, m, H-8), 1.16(1H, m, H-10), 0.86(3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-22), 0.84(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9), 0.69(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9).

14-(*p*-Bromobenzoyl)solandelactone E(91-10-P): UV(MeOH) λ_{\max} 245 nm(ϵ 21600); CD(MeOH) 242.4 nm($\Delta\epsilon$ +10.67); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.88(2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar), 7.56(2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar), 5.86(1H, dd, $J = 15.6$ and 6.1 Hz, H-13), 5.79(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.4 Hz, H-12), 5.76(1H, m, H-4), 5.70(1H, m, H-5), 5.50(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-16), 5.36(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-17), 5.52(1H, q, $J = 6.1$ Hz, H-14), 3.69(1H, dd, $J = 7.3$ and 5.4 Hz, H-11), 2.82(1H, m, H-3), 2.71(1H, ddd, $J = 13.2, 5.9,$ and 2.9 Hz, H-2), 2.60(1H, m, H-6), 2.51(2H, m, H-15), 2.28(1H, m, H-2), 2.21(1H, ddd, $J = 13.7, 8.3,$ and 1.5 Hz, H-6), 2.10(1H, m, H-3), 2.02(2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.32(2H, quin, $J = 7.0$ Hz, H-19), 1.24(4H, m, H-20, H-21), 1.11(1H, m, H-8), 0.97(1H, m, H-10), 0.85(3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-22), 0.72(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9), 0.59(1H, ddd, $J = 8.8, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9).

3. 3. 16. Solandelactone F(91-10-F)의 *p*-bromobenzoylation

20 ml round-bottomed flask에 91-10-F 4.3 mg(11.9 μmol)를 건조된

dichloromethane/pyridine (12.5:1, 10.8 ml)에 녹이고 *p*-bromobenzoyl chloride 33 mg(150.4 μ mol)을 조금씩 첨가시킨 후에 이틀 동안 실온에서 교반시켰다. Rotavapor와 질소 기체를 이용하여 dichloromethane과 pyridine을 제거하였으며 남아 있는 잔류물로부터 원하는 물질을 NP-HPLC(YMC silica normal phase column, 10 x 25 mm, RI detector, flow rate 2 ml/min, 30%(v/v) EtOAc in hexane)를 이용하여 분리하였다. Retention time 9 분에 bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-Q) 2.3 mg(3.2, μ mol, 수율 26.7%), 16분에 11-(*p*-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-R) 2.2 mg(4.1 μ mol, 수율 34.3%), 22분에 14-(*p*-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-S) 2.0 mg(3.7 μ mol, 수율 31.1%)가 얻어 졌다.

Bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-Q): oil; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 7.87(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.86(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.57(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.56(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 5.87(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.4 Hz, H-13), 5.82(1H, dd, $J = 15.6$ and 5.4 Hz, H-12), 5.76(1H, br dt, $J = 11.2$ and 6.6 Hz, H-4), 5.66(1H, $J = 11.2$ and 7.8 Hz, H-5), 5.51(1H, q, $J = 5.4$ Hz, H-14), 5.47(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-16), 5.33(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-17), 5.11(1H, dd, $J = 7.8$ and 5.4 Hz, H-11), 3.97(1H, ddd, $J = 10.5, 8.5,$ and 1.5 Hz, H-7), 2.80(1H, m, H-3), 2.69(1H, ddd, $J = 13.2, 5.9,$ and 2.9 Hz, H-2), 2.52(1H, m, H-6), 2.49(2H, m, H-15), 2.27(1H, ddd, $J = 13.2, 11.7,$ and 4.9 Hz, H-2), 2.10(1H, ddd, $J = 14.2, 8.3,$ and 1.5 Hz, H-6), 2.06(1H, m, H-3), 1.98(2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.26(2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-19), 1.23(4H, m, H-20, H-21), 1.17(1H, m, H-10), 1.07(1H, m, H-8), 0.84(1H, ddd, $J = 8.3, 5.1,$ and 5.1 Hz, H-9), 0.84(3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-22), 0.79(1H, ddd, $J = 8.3, 5.1,$ and 5.1 Hz, H-9).

11-(*p*-Bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-R): UV(MeOH) λ_{max} 244 nm(ϵ 19000); CD(MeOH) 242.5 nm($\Delta\epsilon$ +7.13); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 7.89(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.57(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 5.84(1H, dd, $J = 15.5$ and 5.9 Hz, H-13), 5.77(1H, dd, $J = 15.5$ and 6.8 Hz, H-12), 5.75(1H, m, H-4), 5.70(1H, m, H-5), 5.55(1H, br dt, $J = 10.3$ and 7.3 Hz, H-16), 5.33(1H, br dt, $J = 10.3$ and 7.3 Hz, H-17), 5.15(1H, dd, $J = 6.8$ and 6.8 Hz, H-11), 4.16(1H, q, $J = 5.9$ Hz, H-14), 4.04(1H, br dd, $J = 9.0$ and 9.0 Hz, H-7), 2.82(1H, m, H-3), 2.70(1H, ddd, $J = 13.2, 5.4,$ and 2.4 Hz, H-2), 2.57(1H, m, H-6), 2.29(2H, m, H-15), 2.28(1H, m, H-2), 2.17(1H, br dd, $J = 13.7$ and 8.3 Hz, H-6), 2.10(1H, m, H-3), 2.00(2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.32(2H, quin, $J = 7.1$ Hz, H-19), 1.25(4H, m, H-20, H-21), 1.21(1H, m, H-10), 1.10(1H, m, H-8), 0.85(3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-22), 0.80(2H, m, H-9).

14-(*p*-Bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-S): UV(MeOH) λ_{max} 245 nm(ϵ 19500); CD(MeOH) 241.8 nm($\Delta\epsilon$ +13.67); $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 7.87(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.55(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar), 5.81(2H, m, H-12, H-13), 5.75(1H, br dt, $J = 11.2$ and 6.1 Hz, H-4), 5.66(1H, dd, $J = 11.2$ and 7.3 Hz, H-5), 5.50(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.5 Hz, H-16), 5.35(1H, br dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz, H-17), 5.50(1H, m, H-14), 3.94(1H, br dd, $J = 9.0$ and

9.0 Hz, H-7), 2.80(1H, m, H-3), 2.70(1H, ddd, $J = 13.2, 7.3,$ and 1.5 Hz, H-2), 2.53(1H, m, H-6), 2.50(2H, m, H-15), 2.27(1H, m, H-2), 2.13(1H, ddd, $J = 14.2, 8.3,$ and 1.5 Hz, H-6), 2.10(1H, m, H-3), 2.01(2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.29(2H, quin, $J = 7.0$ Hz, H-19), 1.24(4H, m, H-20, H-21), 0.97(2H, m, H-8, H-10), 0.85(3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-22), 0.75(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9), 0.68(1H, ddd, $J = 8.3, 5.4,$ and 5.4 Hz, H-9).

3. 3. 17. Dimethyl *S*-malate의 합성

5 ml round-bottomed flask에 L-malic acid 0.320 g(23.9 mmol)을 넣고 5% methanolic HCl 용액 1 ml를 가한 후에 하루 동안 교반시켰다. 과량으로 존재하는 HCl을 제거하기 위하여 -78 °C에서 triethylamine 1 mL를 가하여 triethylammonium chloride형태의 염을 만든다. Rotavapor를 이용하여 용매를 증발시키고 난 후에 남은 잔류물에 50% EtOAc/hexane(v/v = 1:1)를 넣어 녹지 않는 염은 여과하여 제거한다. 용매를 제거하고 남은 잔류물로부터 NP-HPLC(YMC Silica normal phase column, 10 x 25 mm, RI detector, flow rate 3.5 ml/min, 15%(v/v) EtOAc in hexane)를 이용하여 분리하였다. Retention time 26 분에서 dimethyl *S*-malate가 0.150 g(0.93 mmol, 수율 38.8%)이 분리되었다.

Dimethyl *S*-malate: oil; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 4.46(1H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.76(3H, s), 3.66(3H, s), 2.81(1H, dd, $J = 16.6$ and 4.4 Hz), 2.74(1H, dd, $J = 16.6$ and 6.3 Hz).

3. 3. 18. Dimethyl *R*-malate의 합성

5 ml round-bottomed flask에 D-malic acid 0.301 g(2.2 mmol)을 넣고 5% methanolic HCl 용액 1 ml를 가한 후에 하루 동안 교반시켰다. 과량으로 존재하는 HCl을 제거하기 위하여 -78 °C에서 triethylamine 1 mL를 가하여 triethylammonium chloride형태의 염을 만든다. Rotavapor를 이용하여 용매를 증발시키고 난 후에 남은 잔류물에 50% EtOAc/hexane(v/v = 1:1)를 넣어 녹지 않는 염은 여과하여 제거한다. 용매를 제거하고 남은 잔류물로부터 NP-HPLC(YMC Silica normal phase column, 10 x 25 mm, RI detector, flow rate 3.5 ml/min, 15%(v/v) EtOAc in hexane)를 이용하여 분리하였다. Retention time 26 분에서 dimethyl *R*-malate가 0.165 g(1.0 mmol, 수율 45.3%)이 분리되었다.

Dimethyl *R*-malate: oil; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 4.46(1H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.76(3H, s), 3.66(3H, s), 2.81(1H, dd, $J = 16.6$ and 4.4 Hz), 2.74(1H, dd, $J = 16.6$ and 6.3 Hz).

3. 3. 19. Dimethyl (menthoxy carbonyl)-*S*-malate의 합성

질소 대기하에서 dimethyl *S*-malate(5.8 mg, 0.036 mmol)를 toluene/pyridine (4:1) 50 μl 에

녹이고 이 용액에 (-)-menthoxycarbonyl chloride 0.6 mL(0.11 M in toluene)를 첨가하였으며 실온에서 3시간 동안 교반시킨 후에 질소에 의해서 반응용매를 제거하였다. 남은 잔류물을 1% EtOAc in hexane(v/v)에 녹이고 작은 silica pressure flash chromatography(1 x 15 cm)를 실시하였다. 1%, 2%, 3% EtOAc in hexane(각각 40, 40, 80 ml)를 흘린 후에 4% EtOAc in hexane(40 ml)에서 dimethyl (menthoxycarbonyl)-*S*-malate가 5.4 mg(0.016 mmol, 수율 43.6 %) 얻어 졌다.

Dimethyl (menthoxycarbonyl)-*S*-malate: oil; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 5.39(1H, dd, $J = 6.8$ and 5.4 Hz, H-2'), 4.55(1H, ddd, $J = 11.0, 11.0,$ and 4.4 Hz, H-3), 3.76(3H, s), 3.70(3H, s), 2.90(2H, m, 3 lines H-3'), 2.04(1H, br d, $J = 11.7$ Hz, H-2), 2.00*(1H, pd, $J = 7.1$ and 2.4 Hz, H-8), 1.66(2H, br d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 1.46(1H, m, H-1), 1.41(1H, ddt, $J = 11.7, 11.7,$ and 3.2 Hz, H-4), 1.05(1H, dd, $J = 11.6$ and 11.6 Hz, H-2), 1.04(1H, m, H-6), 0.90*(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7), 0.89*(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9), 0.85(1H, m, H-6), 0.79(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10)

3. 3. 20. Dimethyl (menthoxycarbonyl)-*R*-malate의 합성

질소 대기하에서 dimethyl *R*-malate(109 mg, 0.67 mmol)를 toluene/pyridine (3:1) 800 μl 에 녹이고 이 용액에 (-)-menthoxycarbonyl chloride 2.5 mL(0.61 M in toluene)를 첨가하였으며 실온에서 5시간 동안 교반시킨 후에 질소에 의해서 반응용매를 제거하였다. 남은 잔류물을 1% EtOAc in hexane(v/v)에 녹이고 작은 silica pressure flash chromatography(2 x 15 cm)를 실시하였다. 1%, 2%, 3% EtOAc in hexane(각각 50 ml)를 흘린 후에 EtOAc(50 ml)를 흘리면 dimethyl (menthoxycarbonyl)-*R*-malate가 125.5 mg(0.36 mmol, 수율 54.4 %) 얻어 졌다.

Dimethyl (menthoxycarbonyl)-*R*-malate: oil; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 5.36(1H, dd, $J = 6.8$ and 5.4 Hz, H-2'), 4.51(1H, ddd, $J = 10.8, 10.8,$ and 4.8 Hz, H-3), 3.76(3H, s), 3.69(3H, s), 2.89(2H, m, 3 lines H-3'), 2.06(1H, br d, $J = 11.7$ Hz, H-2), 1.90*(1H, pd, $J = 7.1$ and 2.9 Hz, H-8), 1.65(2H, br d, $J = 11.7$ Hz, H-5), 1.44(1H, m, H-1), 1.39(1H, ddt, $J = 11.7, 11.7,$ and 2.9 Hz, H-4), 1.07(1H, dd, $J = 11.7$ and 11.7 Hz, H-2), 1.02(1H, m, H-6), 0.89*(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7), 0.86*(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9), 0.84(1H, m, H-6), 0.76(3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10).

3. 3. 21. Bis(menthoxycarbonyl)solandelactone F(91-10-T)의 합성

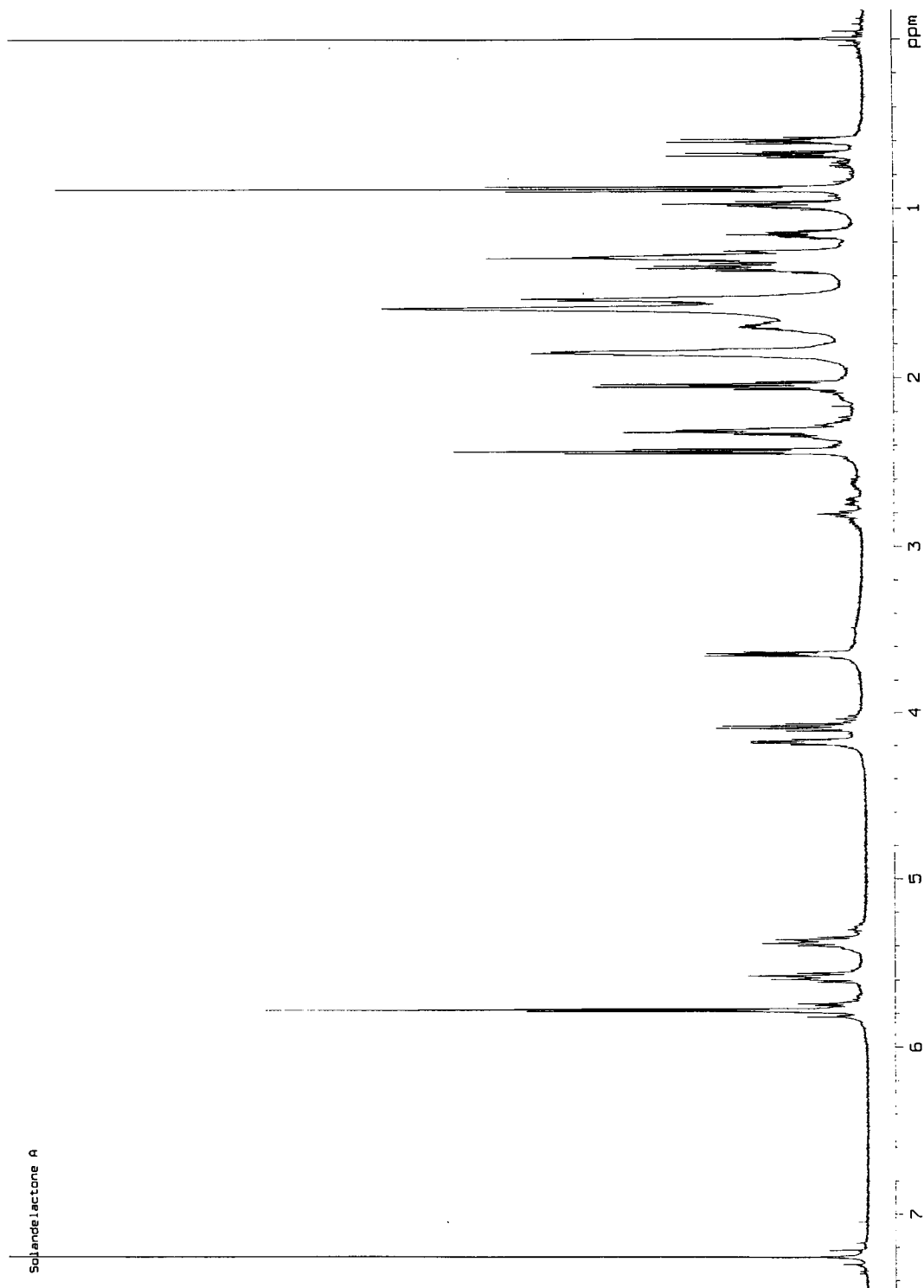
질소 대기하에서 solandelactone F(91-10-F)(7.6 mg, 21 μmol)를 toluene/ pyridine(2:1) 600 μl 에 녹이고 이 용액에 (-)-menthoxycarbonyl chloride 1 mL(0.11 M in toluene)를 첨가하였으며 실온에서 1.5시간 동안 교반시킨 후에 질소에 의해서 반응용매를 제거하였다. 남은 잔류물을

hexane에 녹이고 작은 silica pressure flash chromatography(1 x 15 cm)를 실시하였다. 100% hexane, 3%, 6%, 10% EtOAc in hexane, 100% EtOAc(각각 40 ml)를 흘린 후에 ^1H NMR spectrum으로 확인하여 6% EtOAc in hexane 분획에서 원하는 bis(menthoxycarbonyl) solandelactone F (91-10-T)가 4.9 mg(6.7 μmol , 수율 32.1 %) 얻어 졌다.

Bis(menthoxycarbonyl)solandelactone F(91-10-T): oil: ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.75(2H, m, H-4, H-13), 5.69(2H, m, H-5, H-12), 5.49(1H, br dt, $J = 18.1$ and 7.3 Hz), 5.28(1H, br dt, $J = 18.1$ and 7.6 Hz), 5.07(1H, dd, $J = 6.0$ and 6.0 Hz, H-14), 4.70(1H, dd, $J = 8.1$ and 5.1 Hz, H-11), 4.47(2H, m, 7 lines), 3.93(1H, br t, $J = 9.3$ Hz, H-7), 2.81(1H, m, H-3), 2.70(1H, ddd, $J = 13.7$, 5.9 , and 2.9 Hz, H-2), 2.54(1H, ddd, $J = 14.2$, 10.3 , and 6.8 Hz, H-6), 2.40(2H, m, H-15), 2.27(1H, br dt, $J = 12.5$ and 4.4 Hz, H-2), 2.17(1H, br dd, $J = 14.2$ and 7.8 Hz, H-6), 2.05-1.88(7H, m, H-3, H-18), 1.66(4H, m), 1.47-1.36(4H, m), 1.31(2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-19), 1.25(4H, m, H-20, H-21), 1.09(1H, m, H-10), 1.05-0.96(5H, m, H-8), 0.92-0.83(17H, m, H-22), 0.80-0.75(2H, m, H-9), 0.75(3H, d, $J = 6.8$ Hz).

3. 3. 22. Bis(menthoxycarbonyl)solandelactone(91-10-T)의 ozonolysis

Bis(menthoxycarbonyl)solandelactone(91-10-T)(4.9 mg, 6.7 μmol)를 chloroform 1 ml에 녹이고 이 용액을 -42 $^\circ\text{C}$ (acetonitrile과 dry ice)로 냉각시킨 후에 오존을 5분간 통과 시키고 (Fischer 500 M model, 0.20 bar NI/h, power 30) 실온에서 10분간 교반 시켰다. 질소 가스에 의하여 용매를 제거한 후에 진한 acetic acid 1 ml와 30% hydrogen peroxide 300 μl 를 첨가하고 50 $^\circ\text{C}$ 에서 13시간 반응시켰으며 역시 용매는 질소 가스에 의하여 제거하였다. 남은 잔류물은 dry THF 3 ml에 녹이고 과량의 diazomethane과 ice bath하에서 5분간 반응시켰으며 마찬가지로 질소 가스에 의하여 용매를 제거하였다. 남은 잔류물을 hexane에 녹이고 작은 flash pressure silica chromatography(1x15)로 분리하였다. 100% hexane, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% EtOAc in hexane를 흘린 후에 ^1H NMR spectrum으로 확인한 결과 3% EtOAc in hexane 분획에서 원하는 물질이 0.5 mg 얻어 졌다. 합성된 authentic sample와 ^1H NMR spectrum 데이터를 비교한 결과 dimethyl (menthoxycarbonyl)-S-malate와 동일한 것으로 확인되었다. 또 GC로 분석하였으며 retention time 23.917 분(170 $^\circ$, SPTM-1 capillary column 0.32 mm x 25 m)에서 peak가 나타났다. 이 retention time과 standard(S-malate 24.039 분, R-malate 24.296 분)를 비교해 본 결과 100% S-malate라는 것을 확인할 수 있었다.



Solandelactone A

Fig. 3-8. Proton NMR spectrum of solandelactone A(91-10-A).

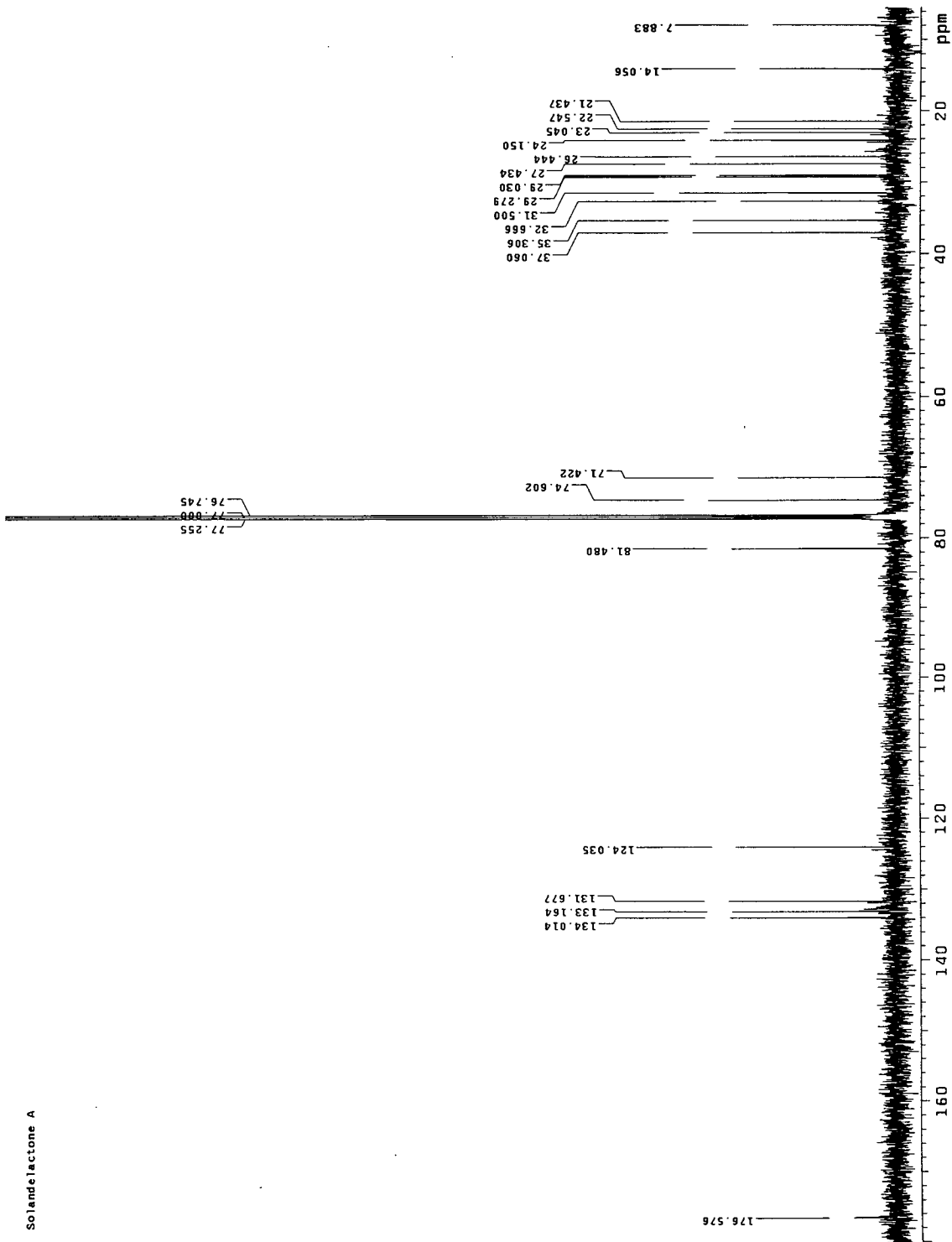


Fig. 3-9. Carbon NMR spectrum of solandelactone A(9I-10-A).

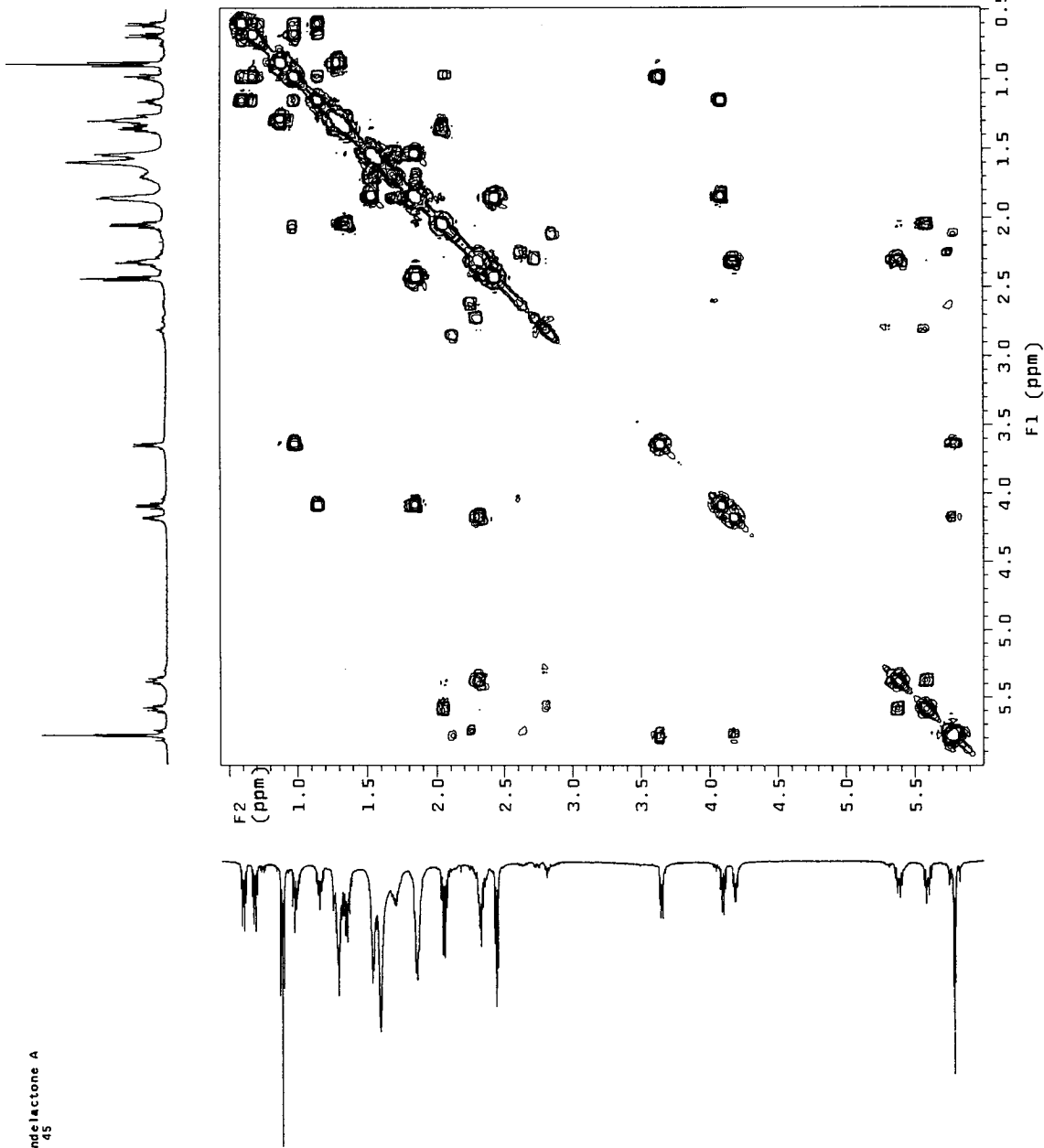


Fig. 3-10. Proton COSY spectrum of solandelactone A(91-10-A).

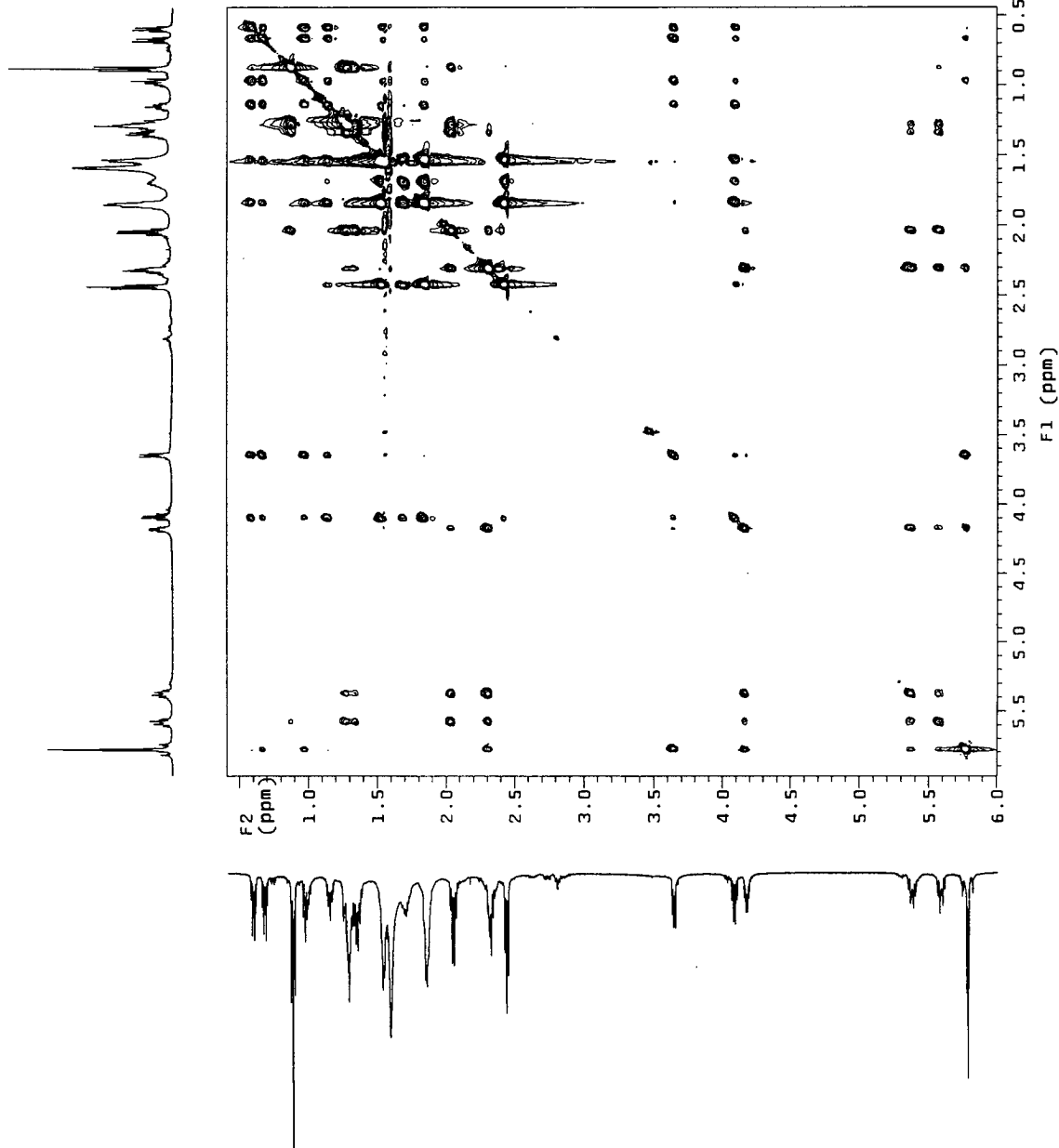


Fig. 3-11. TOCSY spectrum of solandelactone A(91-10-A).

Solandelactone A
HMQC

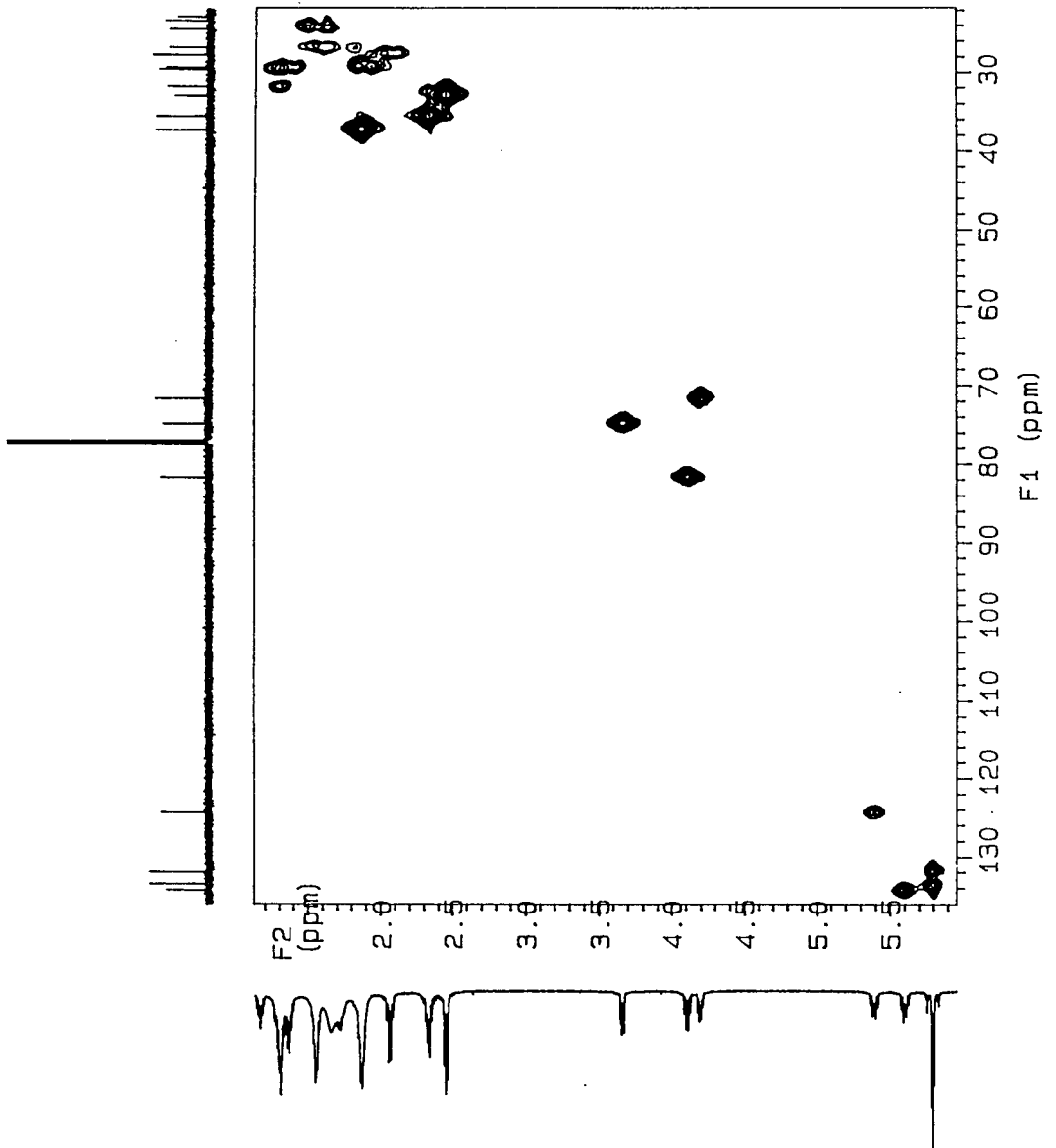


Fig. 3-12. HMQC spectrum of solandelactone A(91-10-A).

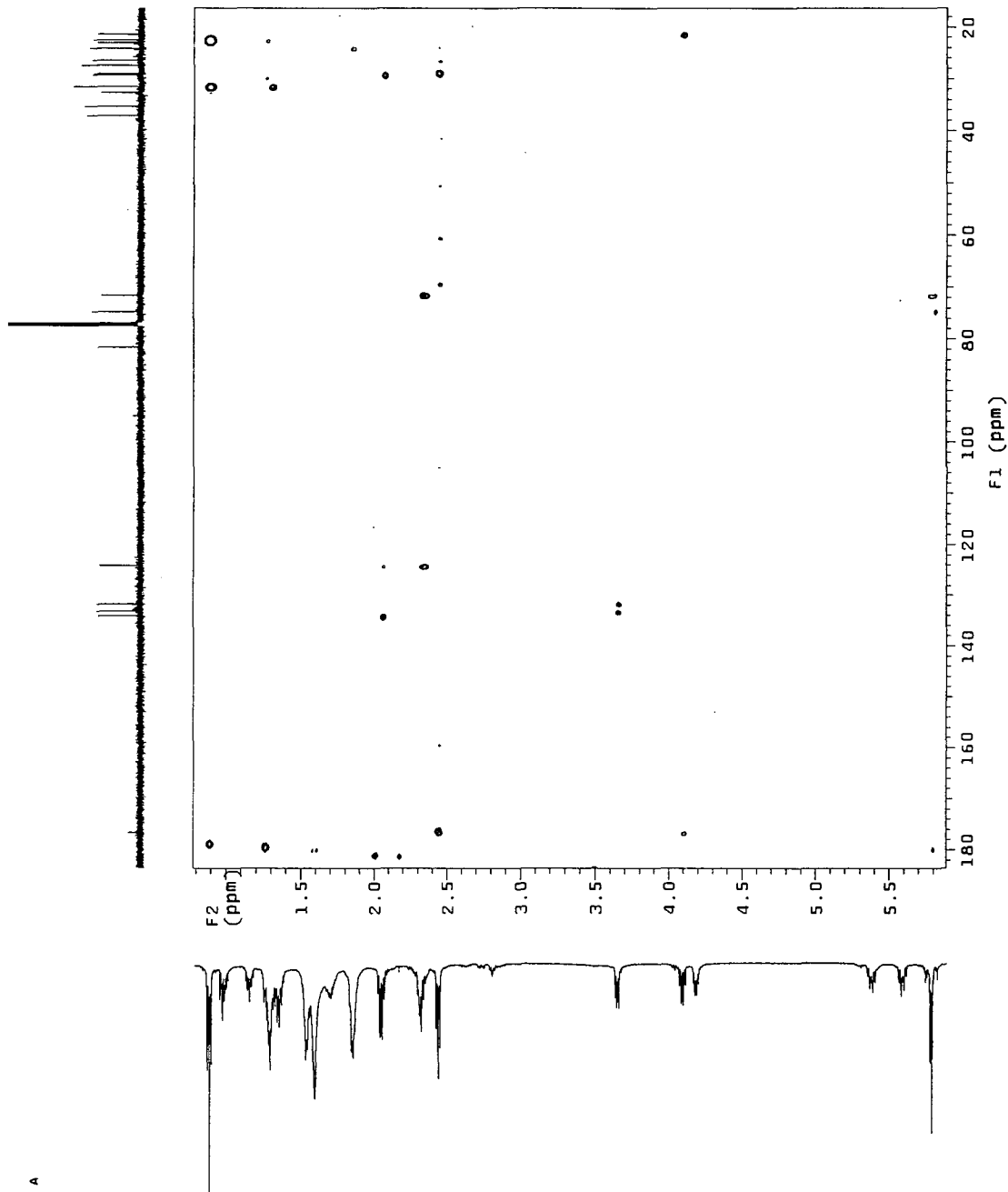


Fig. 3-13. HMBC spectrum of solandelactone A(91-10-A).

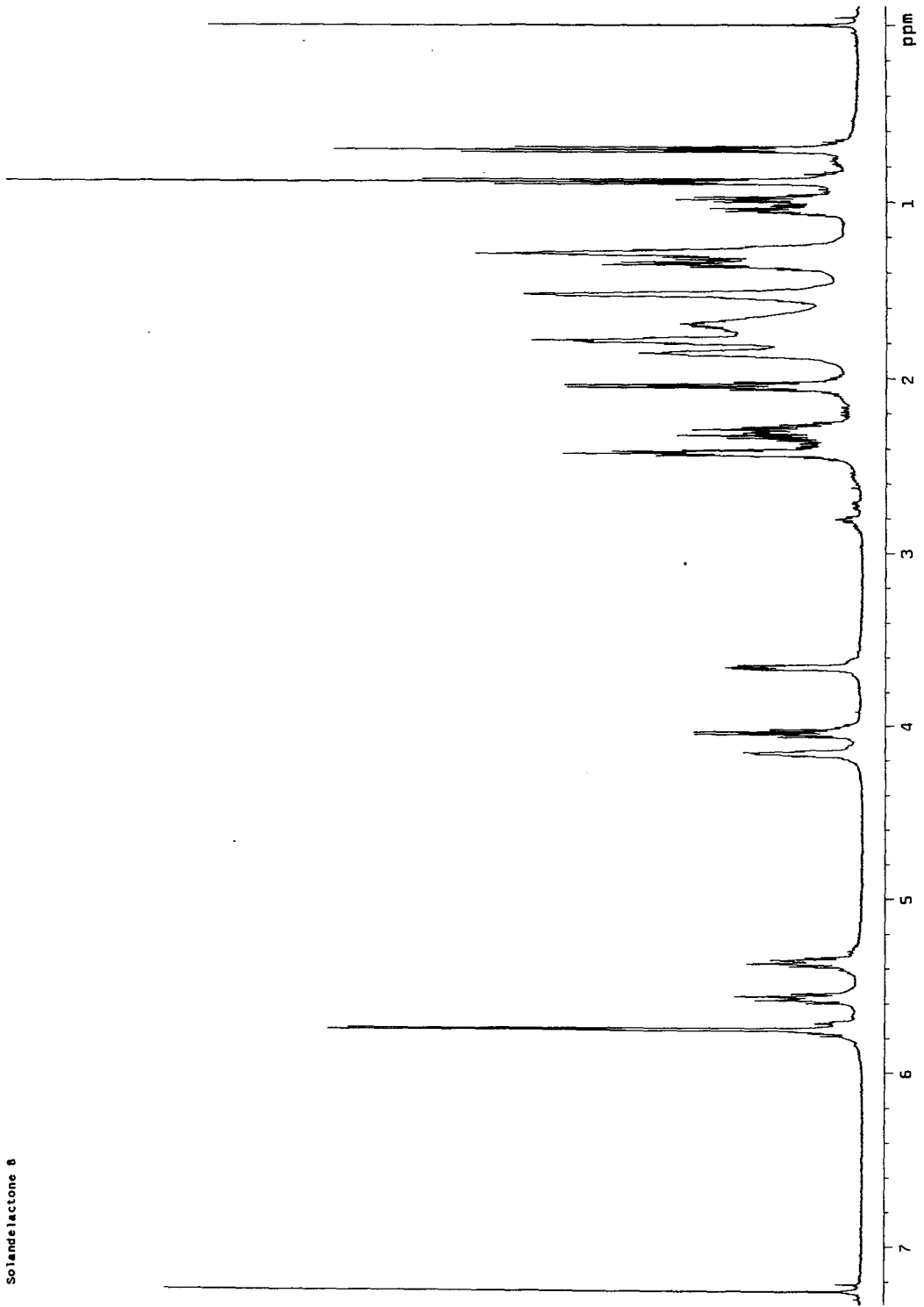


Fig. 3-14. Proton NMR spectrum of solandelactone B(91-10-B).

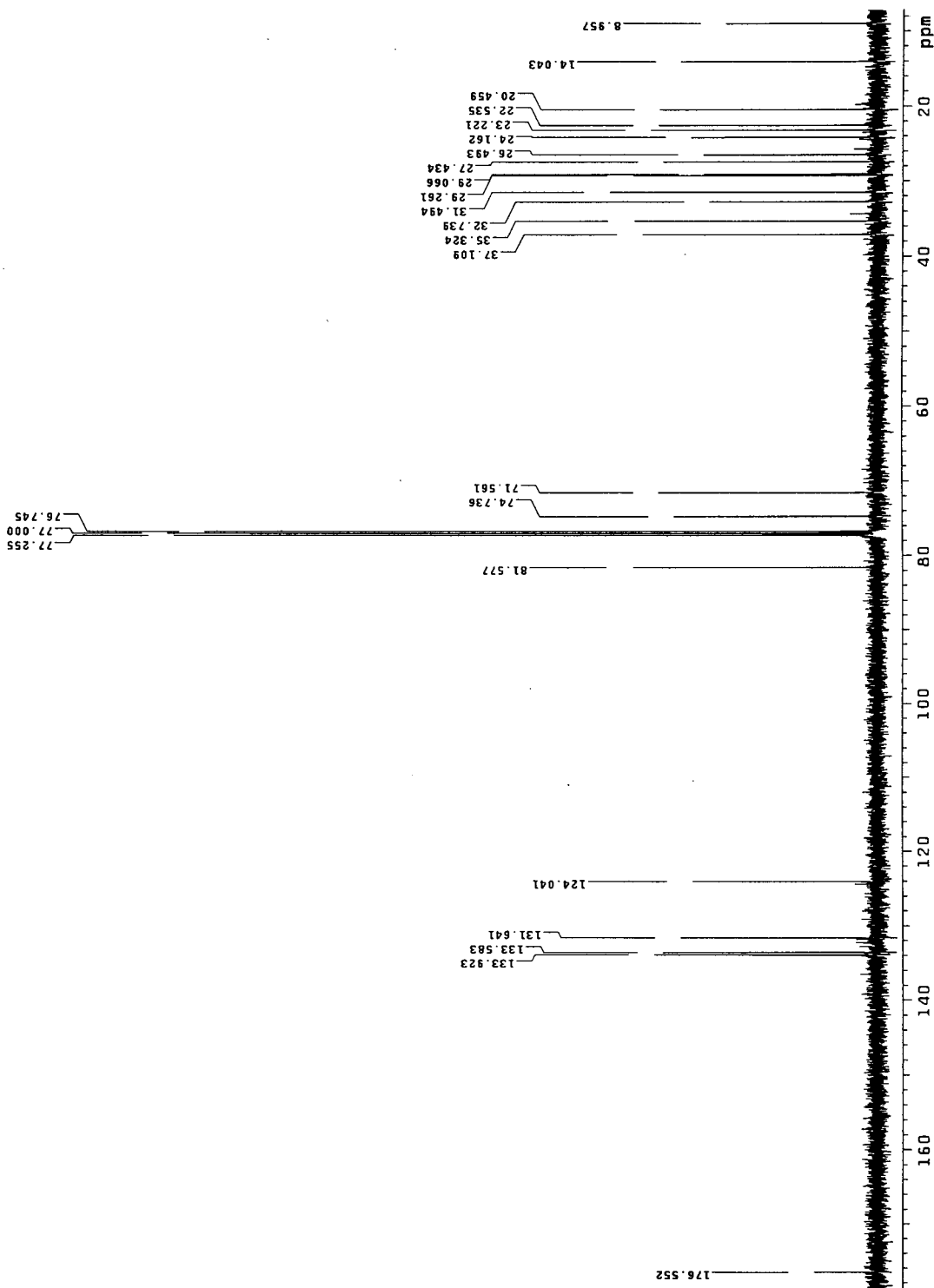


Fig. 3-15. Carbon NMR spectrum of solandielactone B(91-10-B).

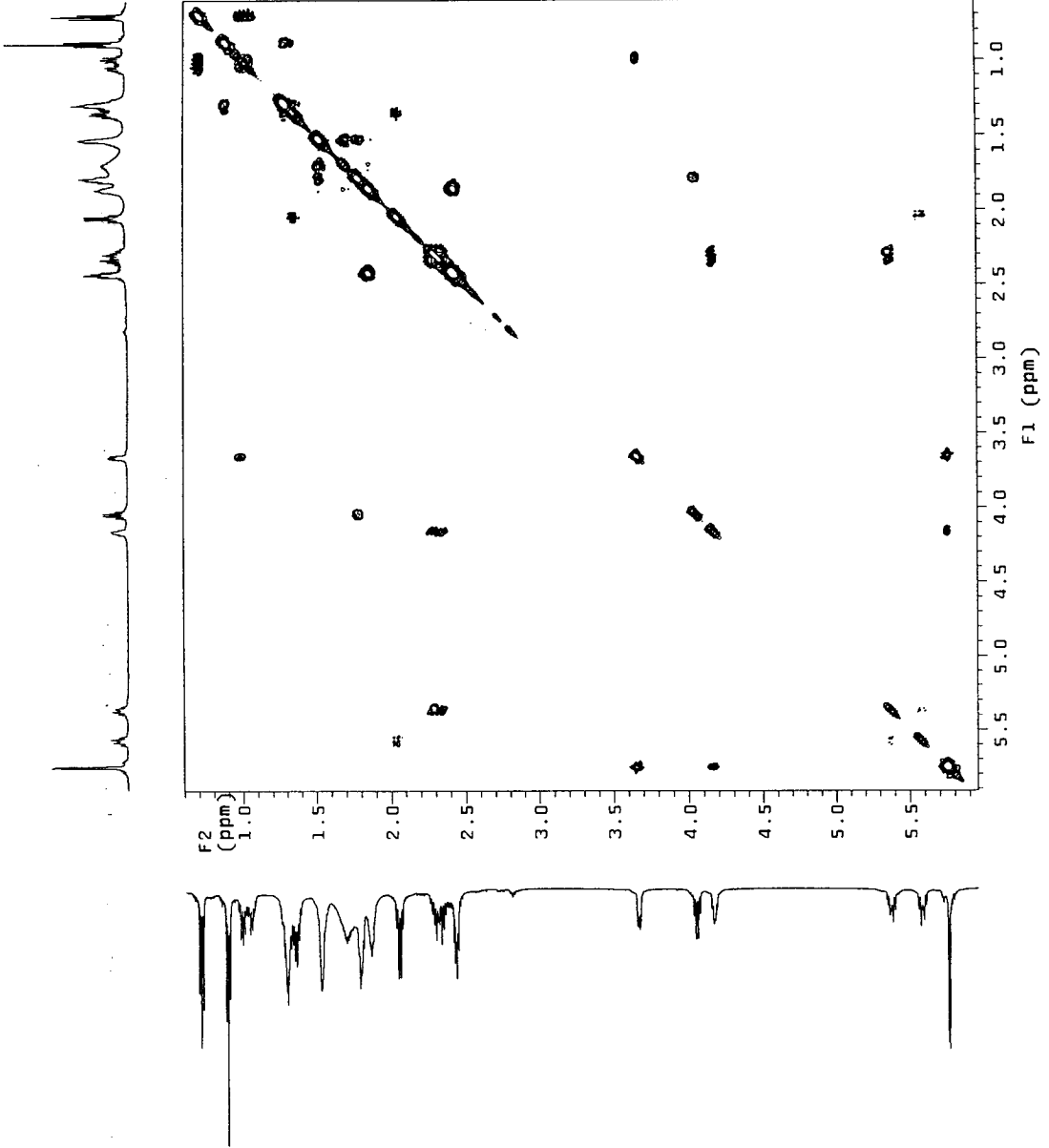


Fig. 3-16. Proton COSY spectrum of solandelactone B(91-10-B).

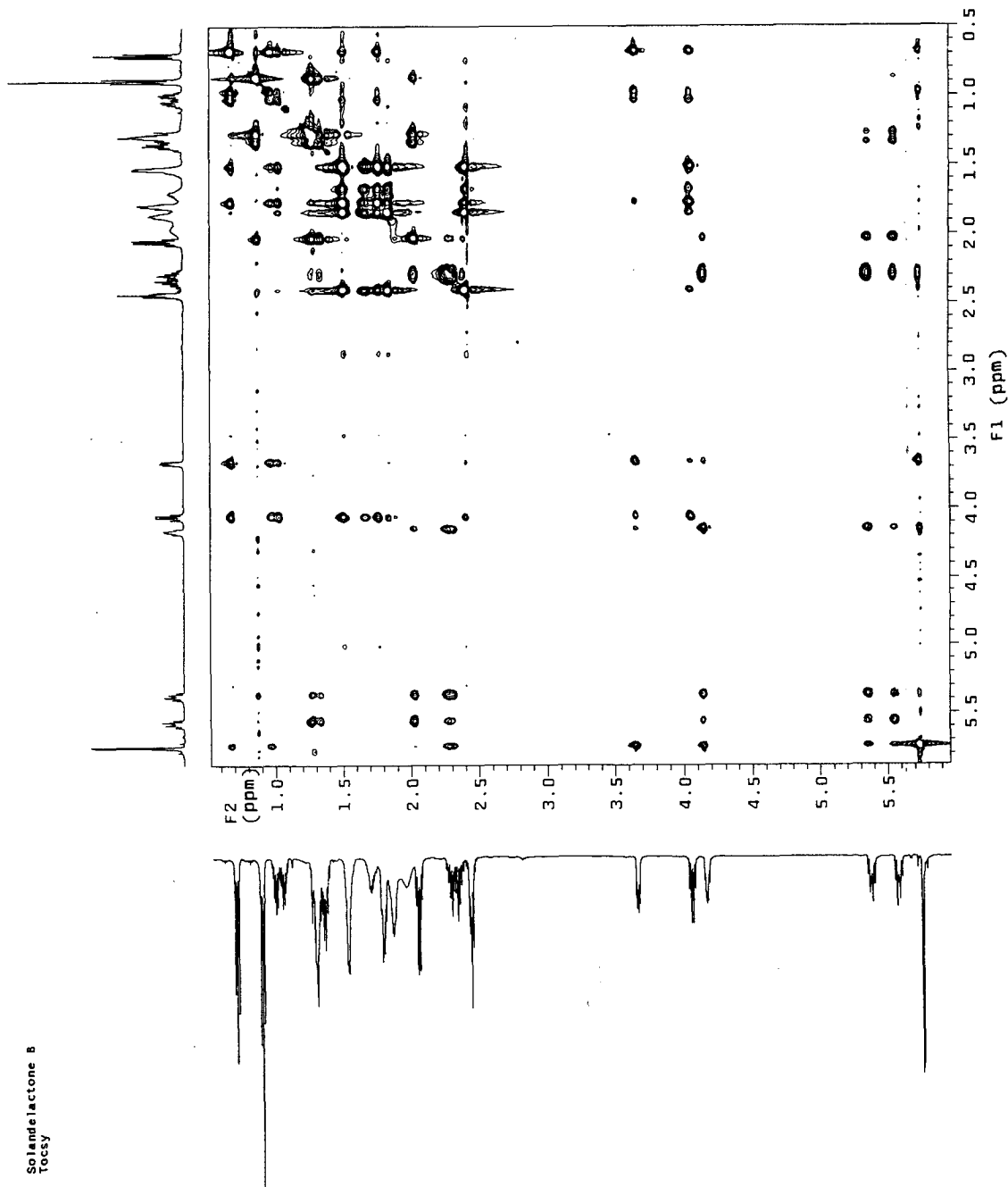


Fig. 3-17. TOCSY spectrum of solandelactone B(91-10-B).

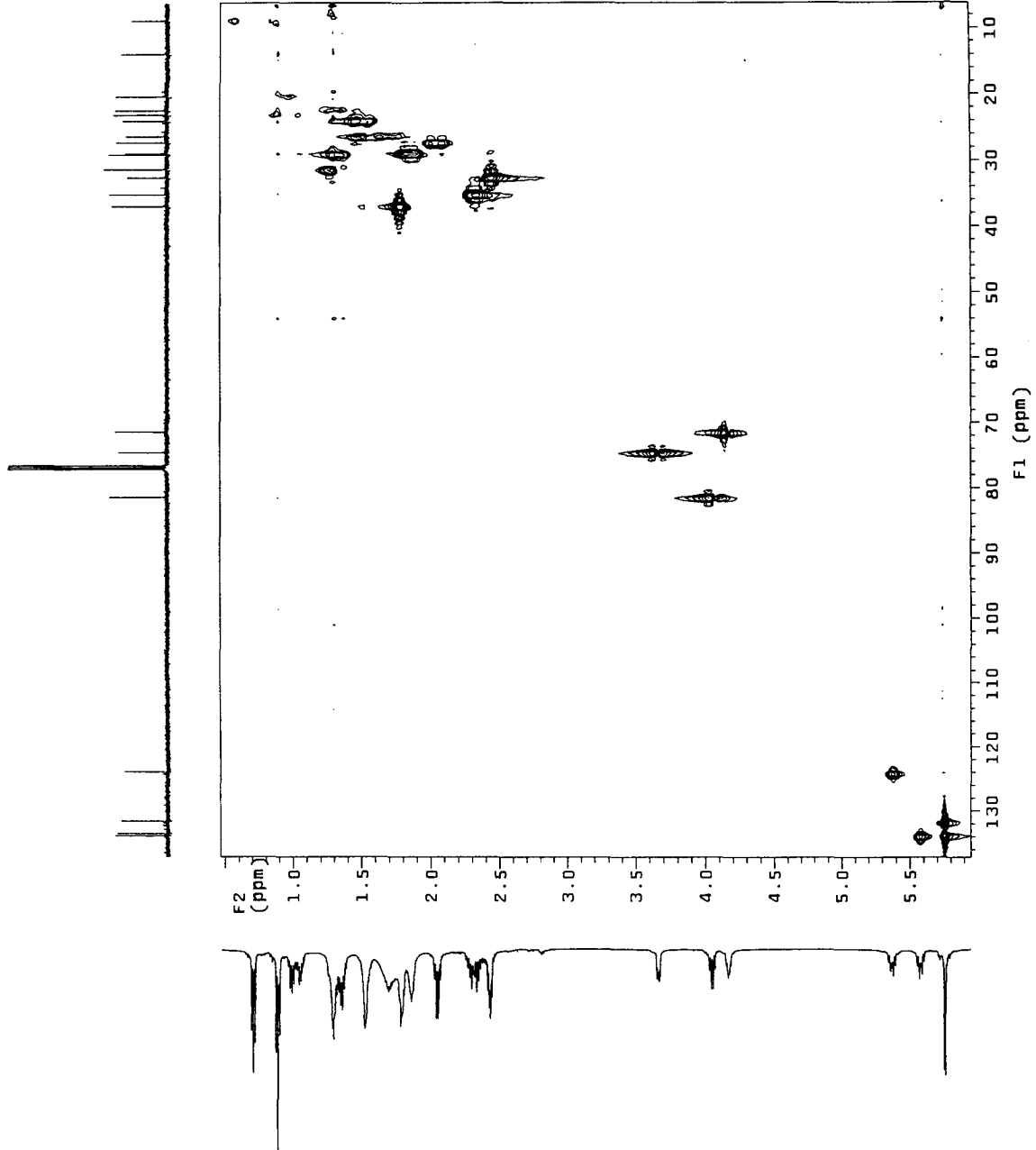


Fig. 3-18. HMQC spectrum of solandelactone B(91-10-B)

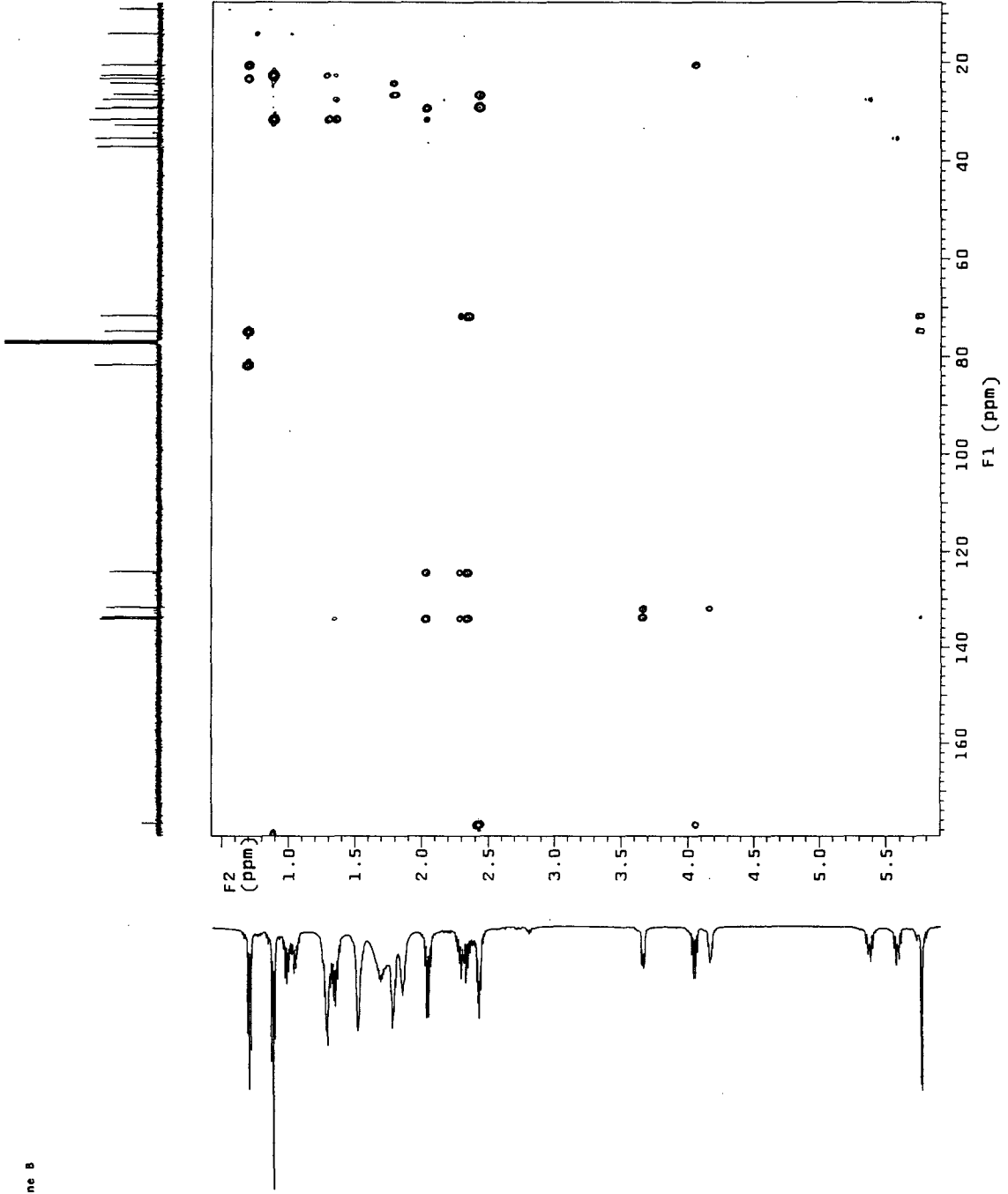


Fig. 3-19. HMBC spectrum of solandelactone B(91-10-B).

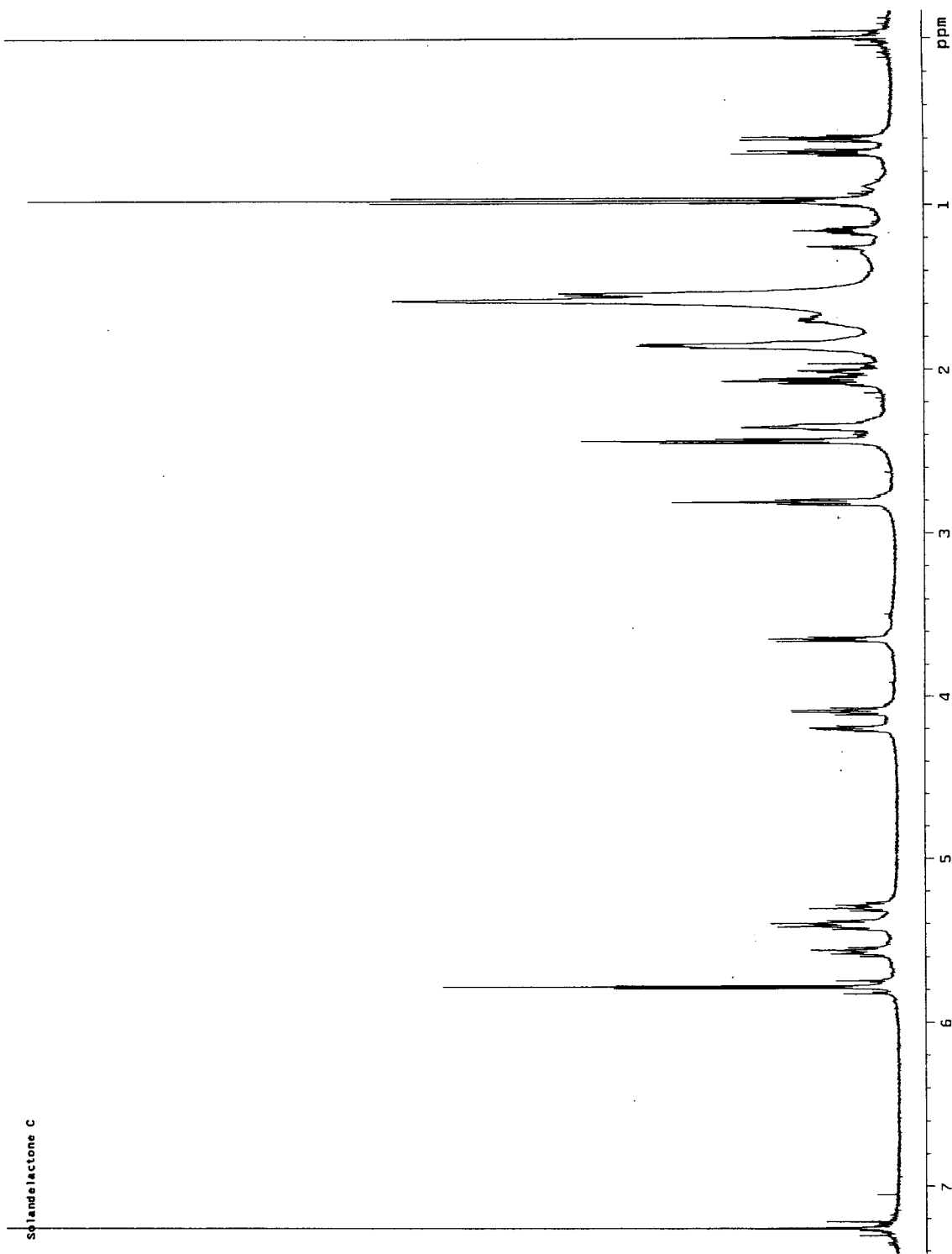


Fig. 3-20. Proton NMR spectrum of solandelactone C(91-10-C).

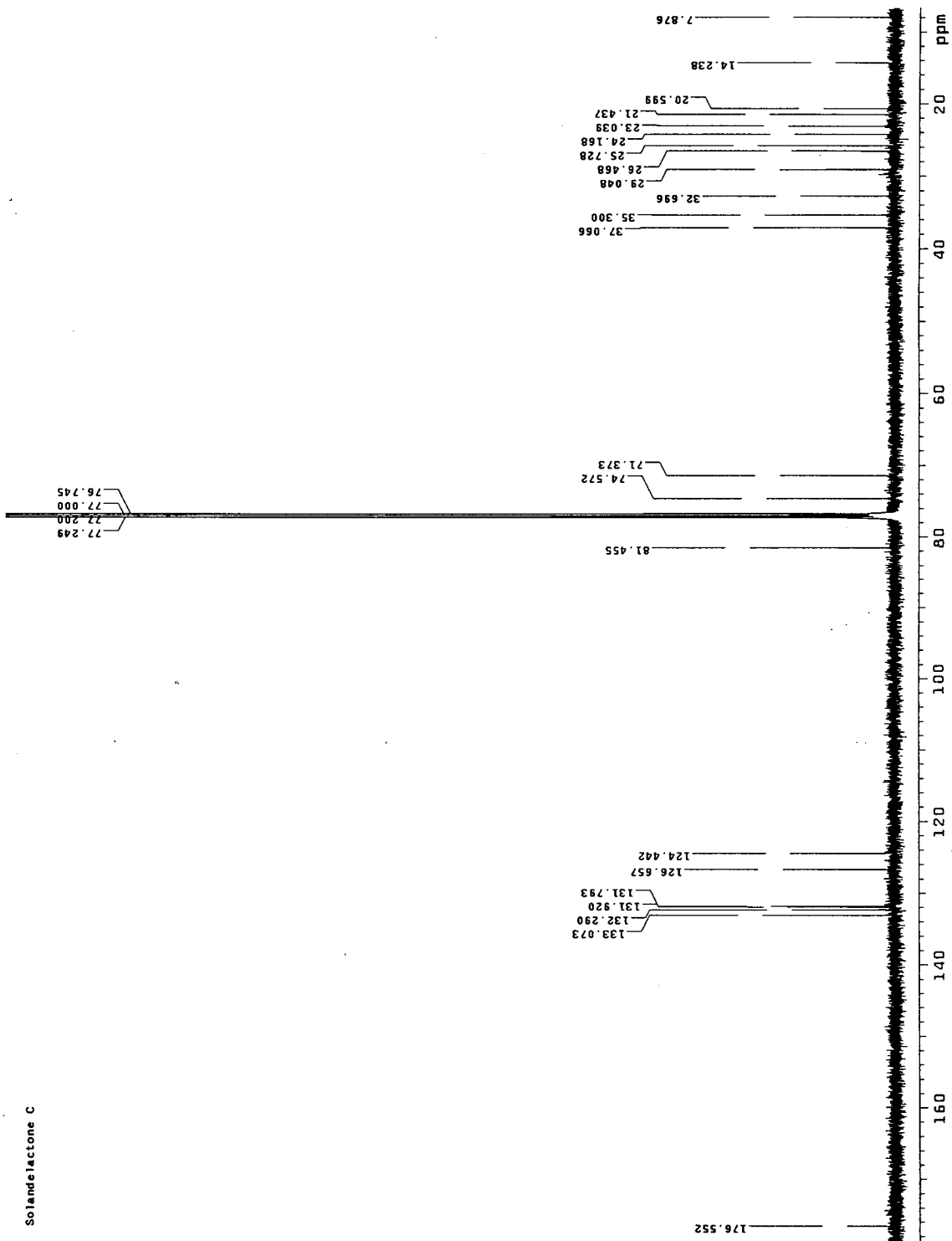


Fig. 3-21. Carbon NMR spectrum of solandelactone C(91-10-C).

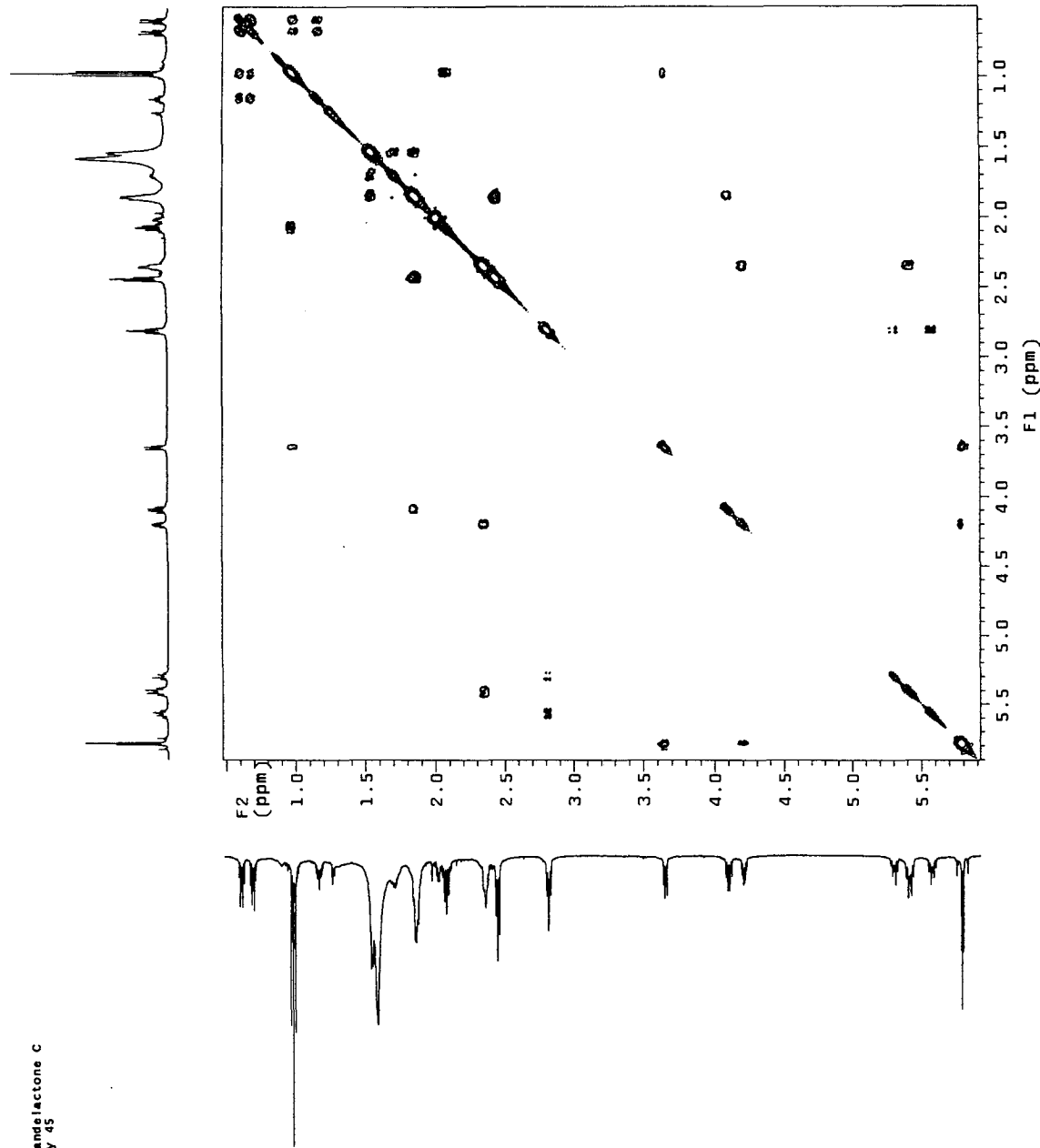


Fig. 3-22. Proton COSY spectrum of solandelactone C(91-10-C).

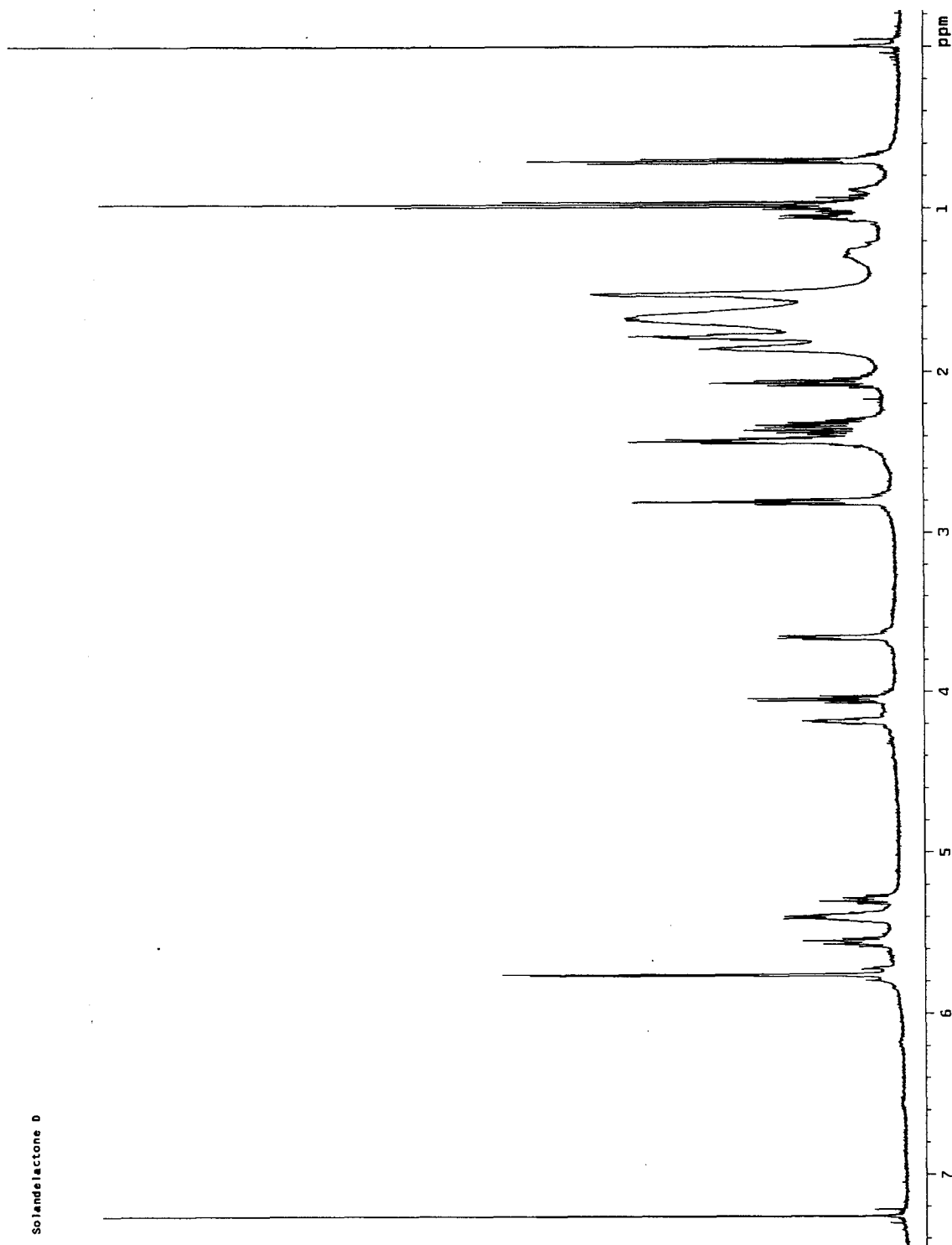


Fig. 3-23. Proton NMR spectrum of solandelactone D(91-10-D).

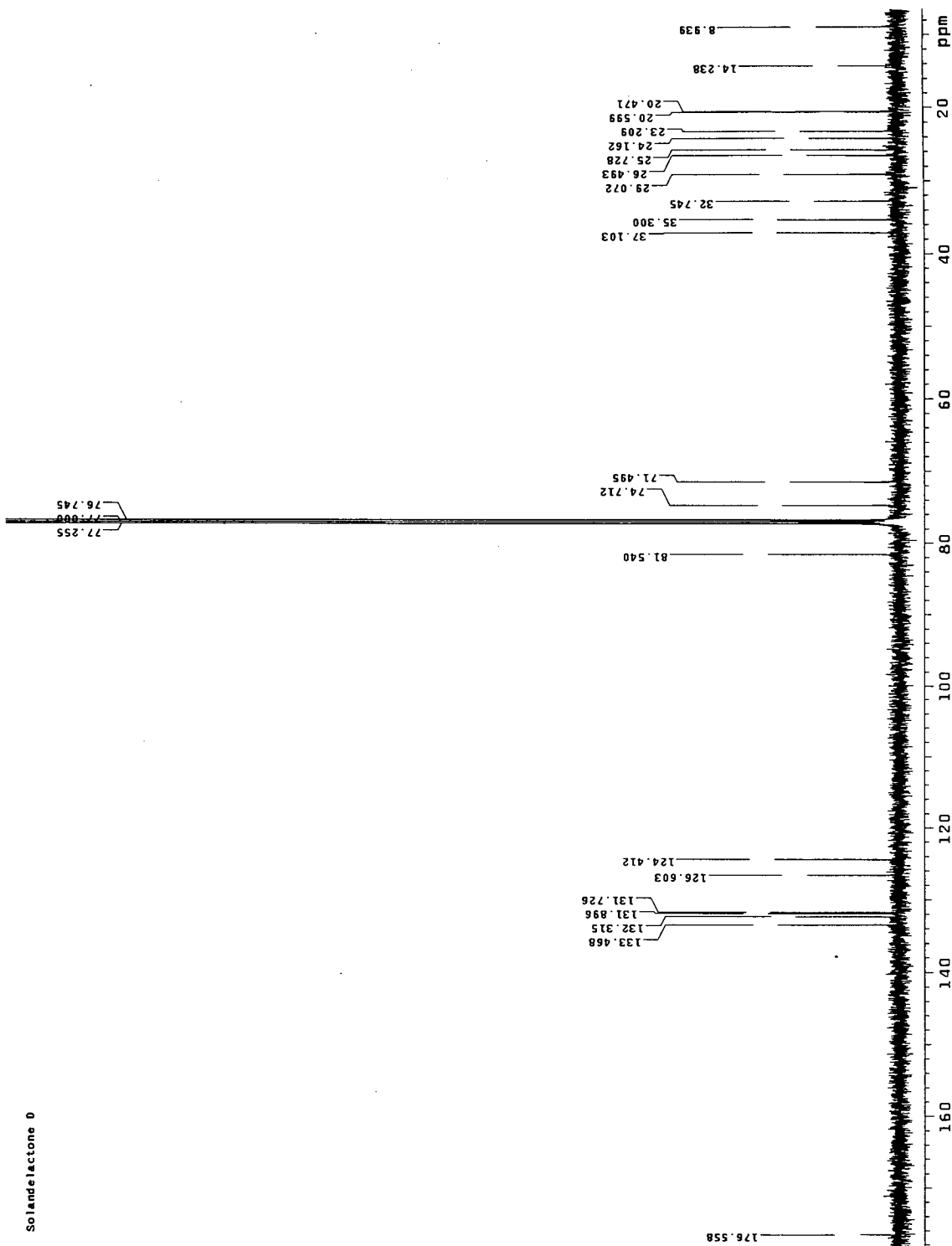


Fig. 3-24. Carbon NMR spectrum of solandelactone D(91-10-D).

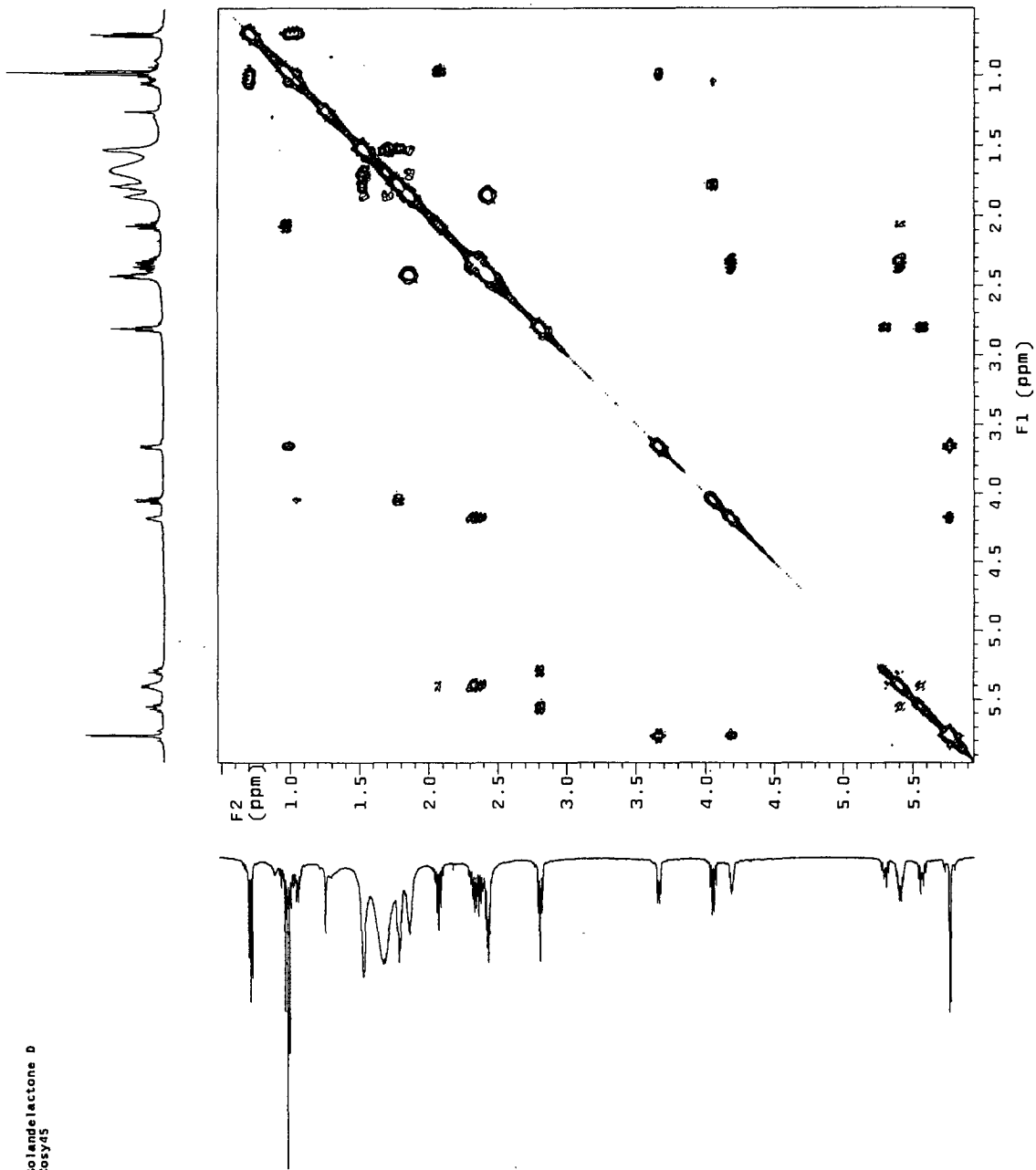


Fig. 3-25. Proton COSY spectrum of solandelactone D(91-10-D).

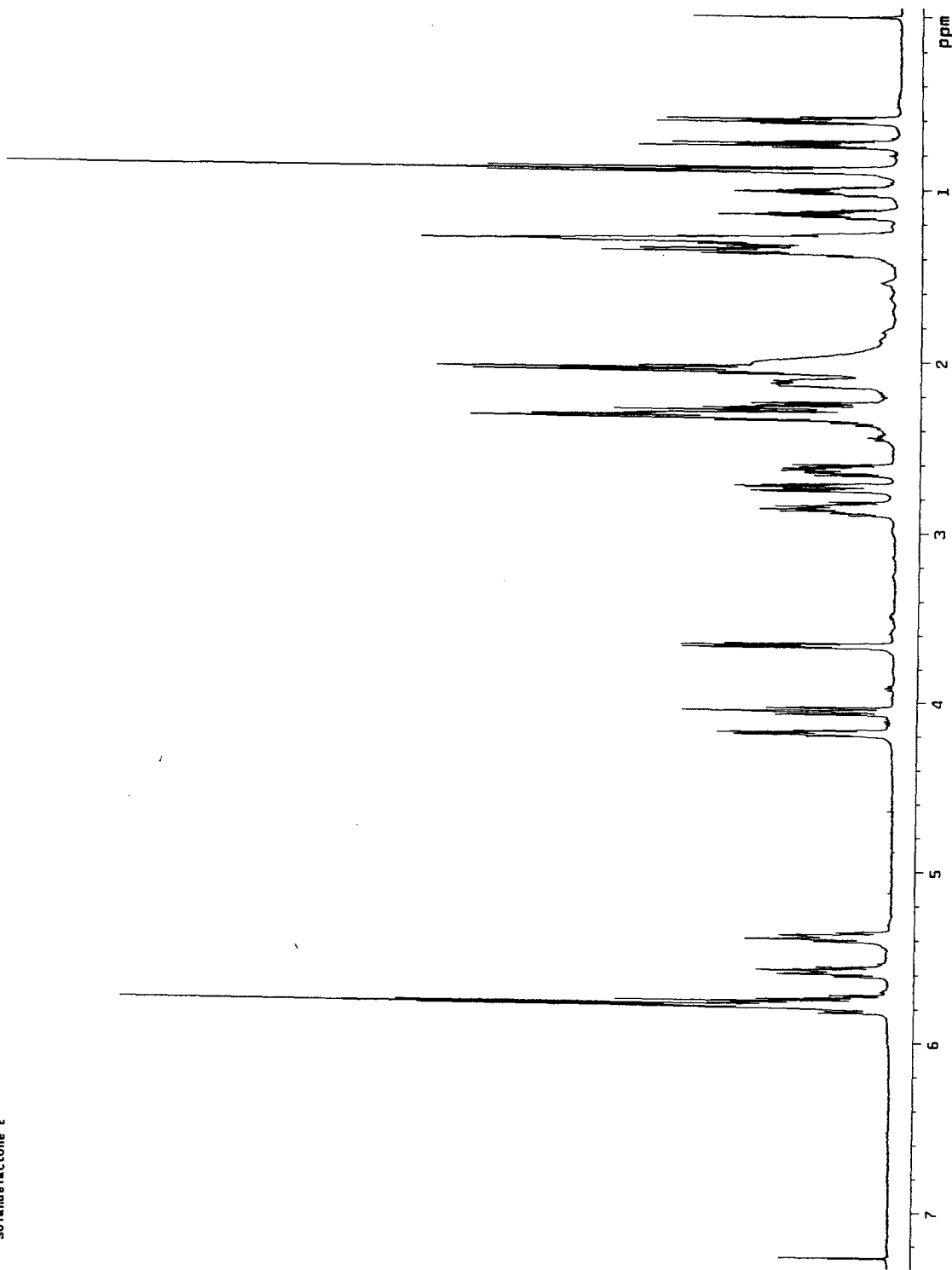


Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of solandelactone E(91-10-E).

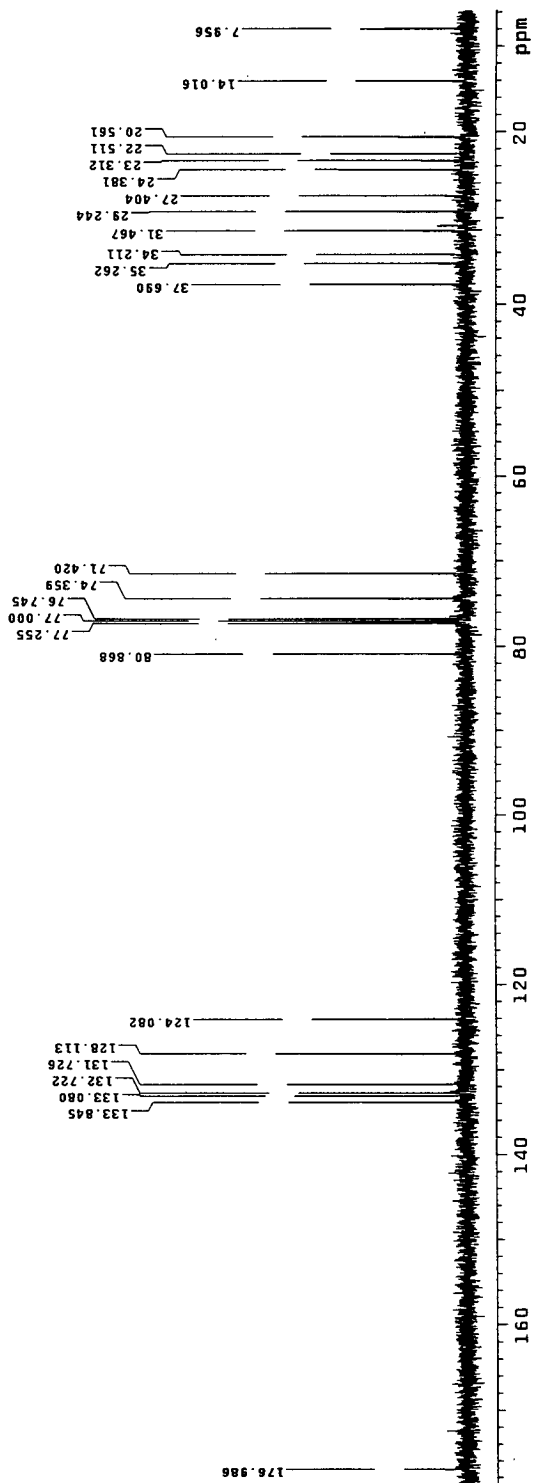


Fig. 3-27. Carbon NMR spectrum of solandelactone E(91-10-E).

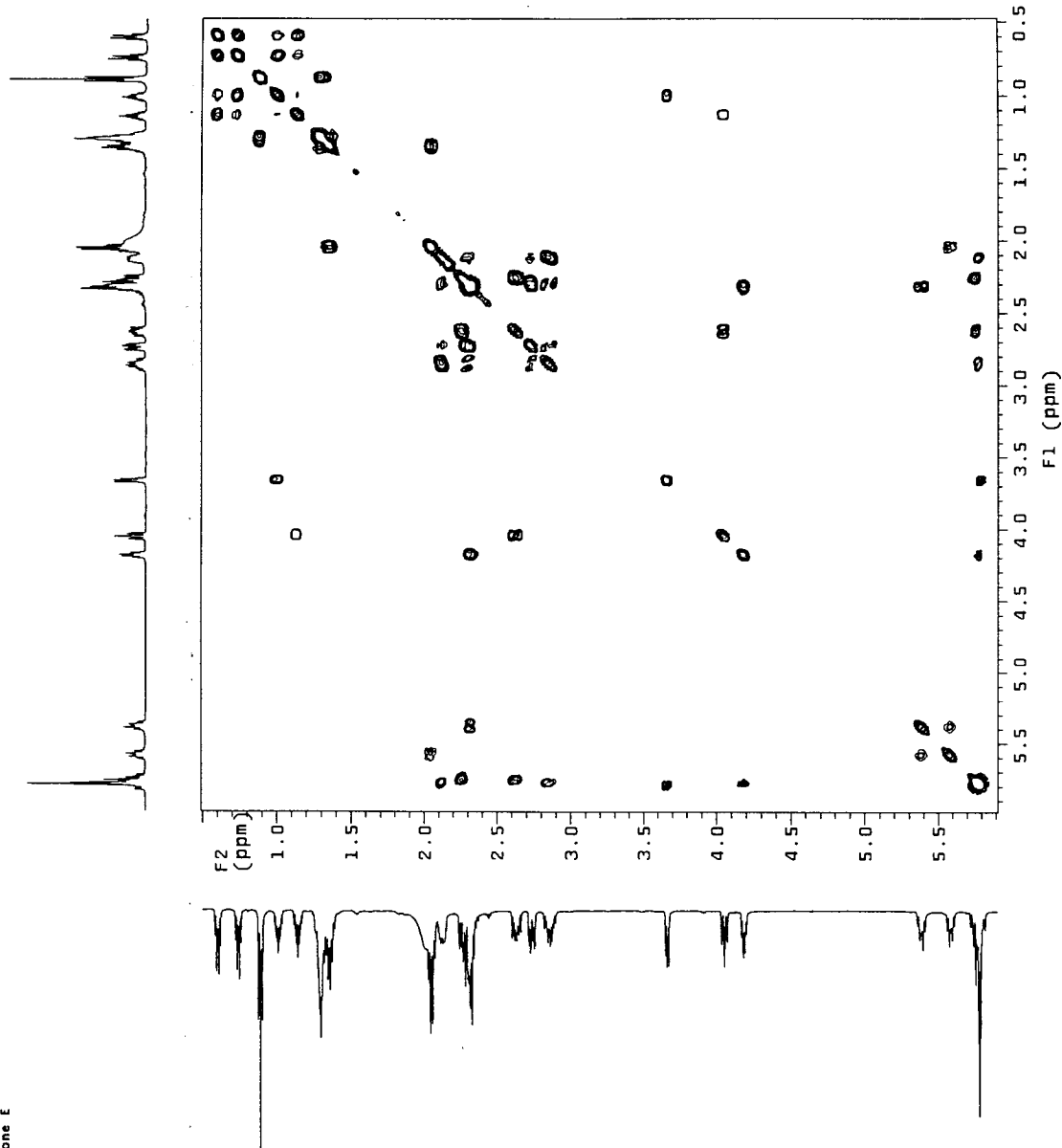


Fig. 3-28. Proton COSY spectrum of solandelactone E(91-10-E).

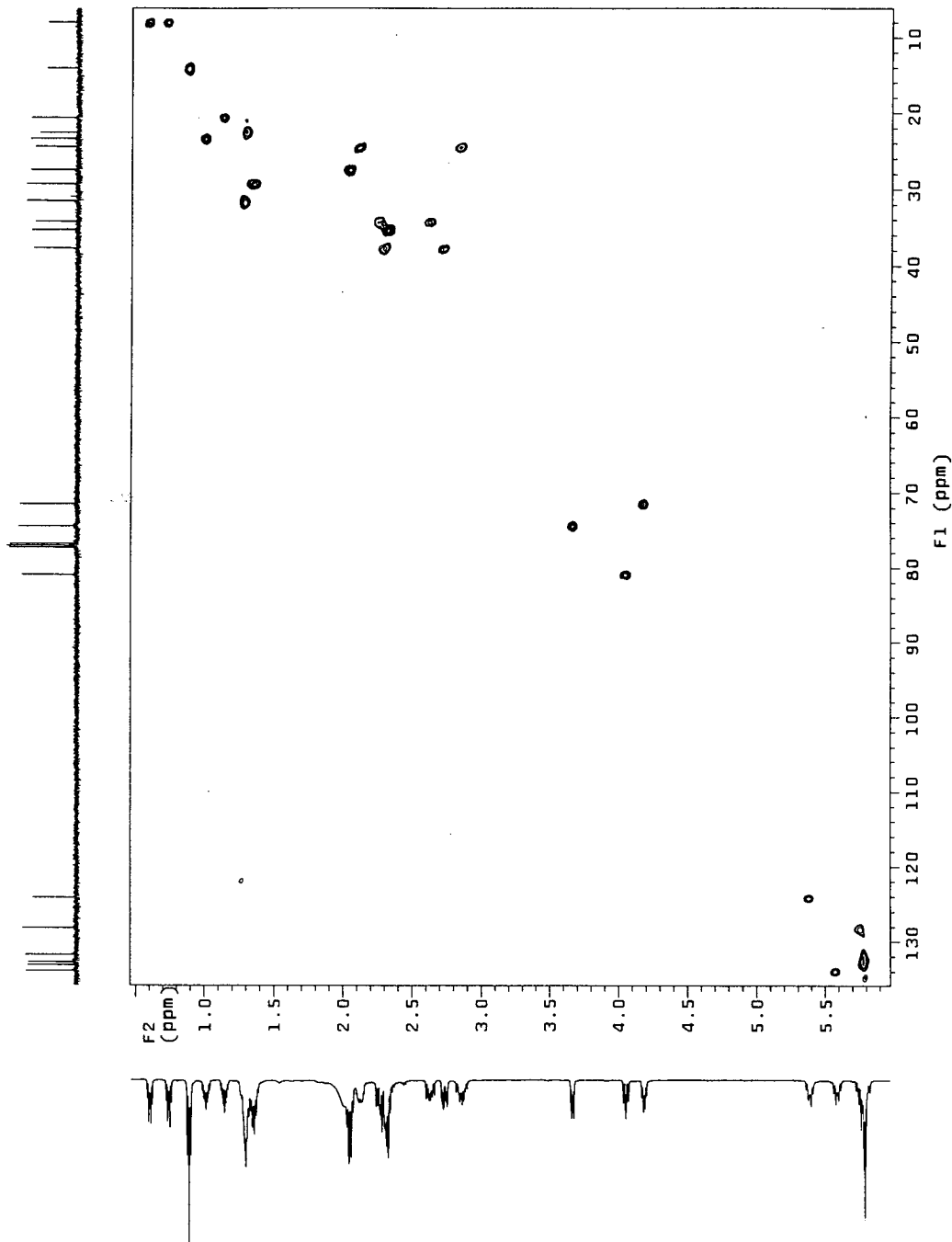


Fig. 3-30. HMOC spectrum of solandelactone E(91-10-E).

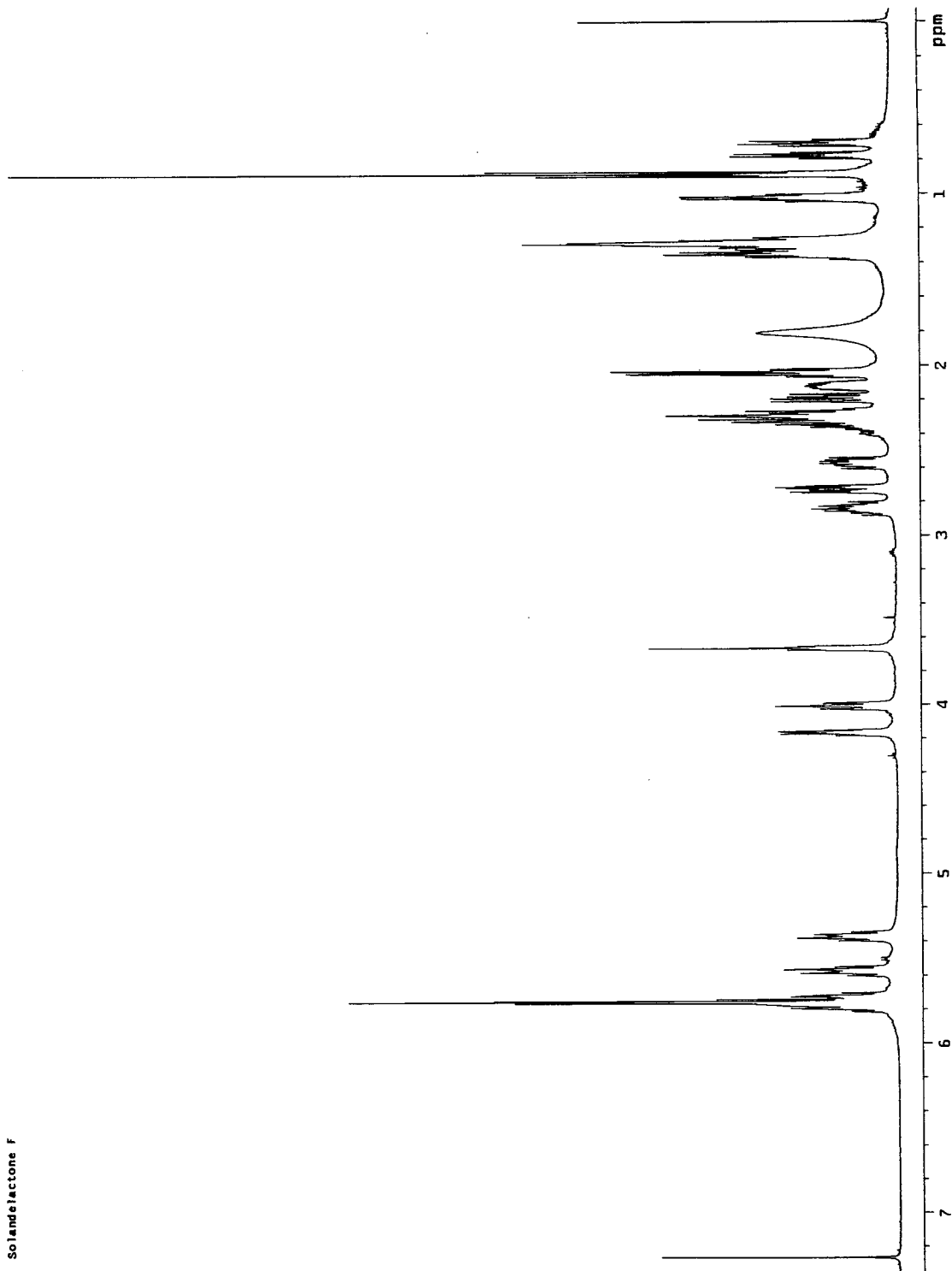


Fig. 3-31. Proton NMR spectrum of solandelactone F(9I-10-F).

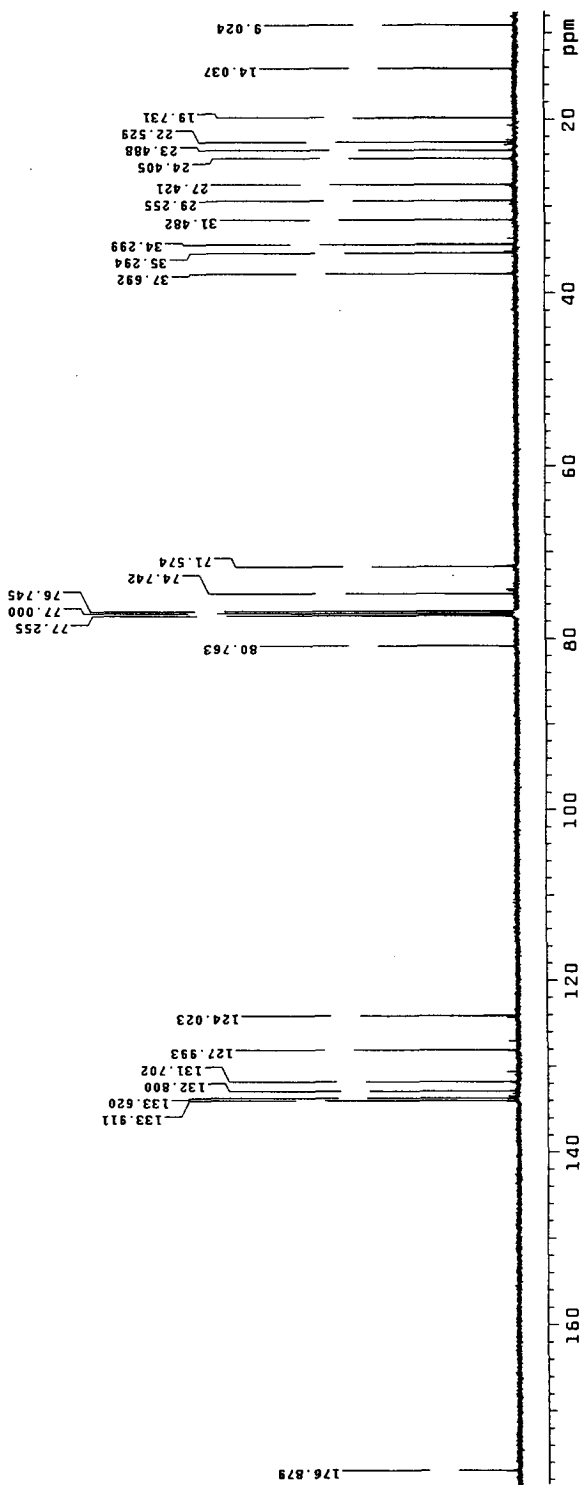


Fig. 3-32. Carbon NMR spectrum of solandelactone F(91-10-F).

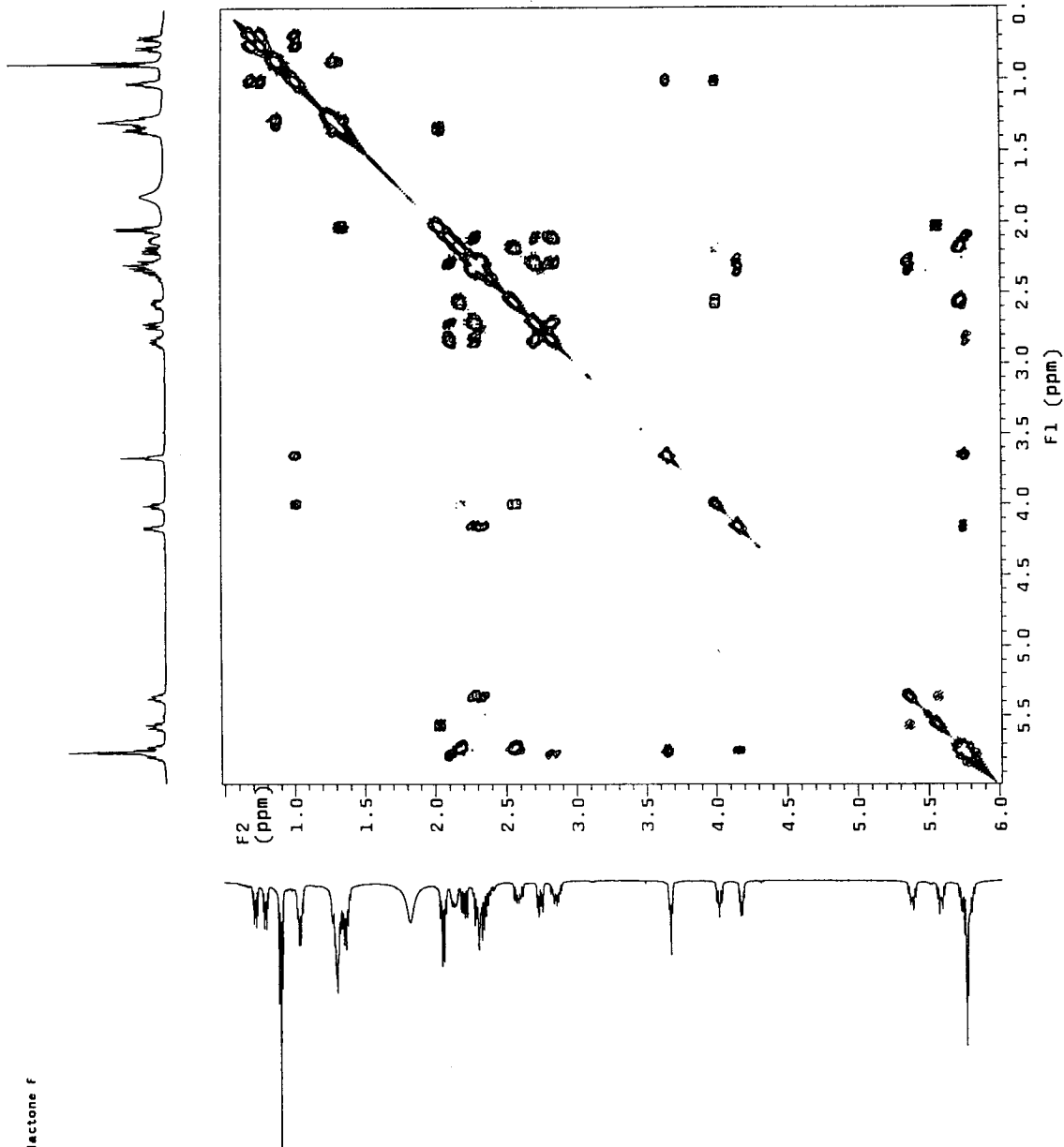


Fig. 3-33. Proton COSY spectrum of solandelactone F(91-10-F)

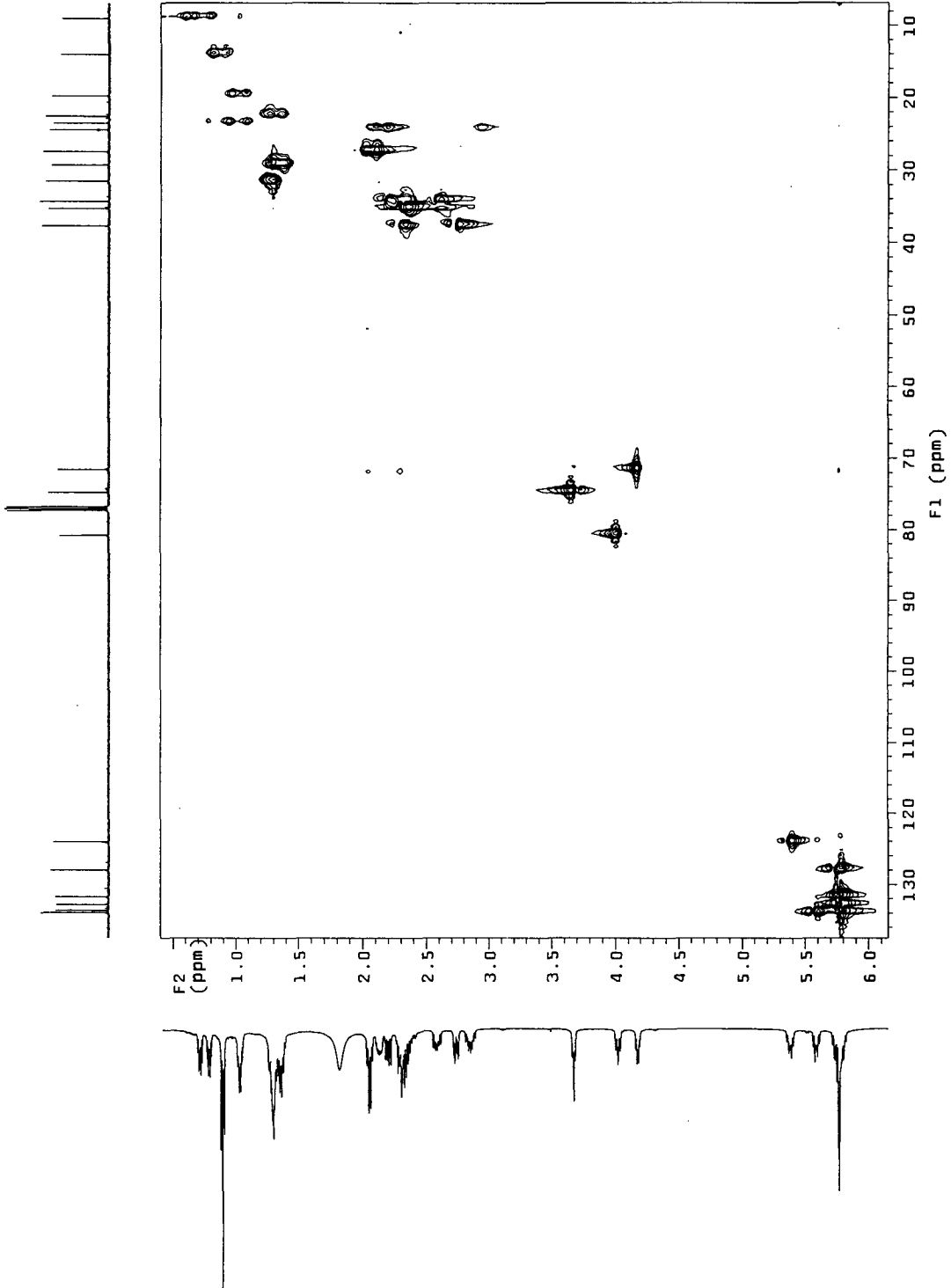


Fig. 3-34. HMQC spectrum of solandelactone F(91-10-F).

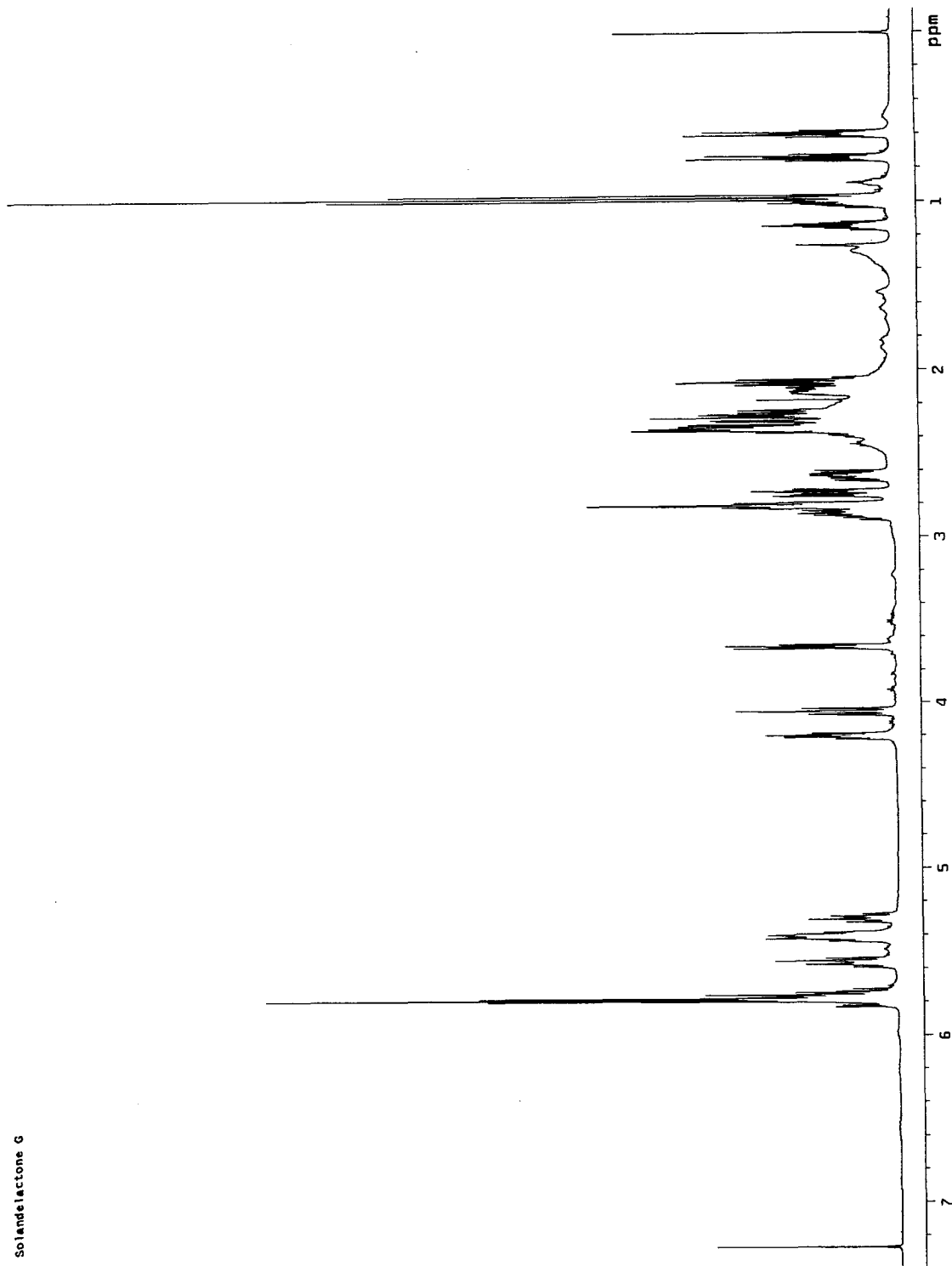


Fig. 3-35. Proton NMR spectrum of solandelactone G(91-10-G).



Fig. 3-36. Carbon NMR spectrum of solandelactone G(91-10-G).

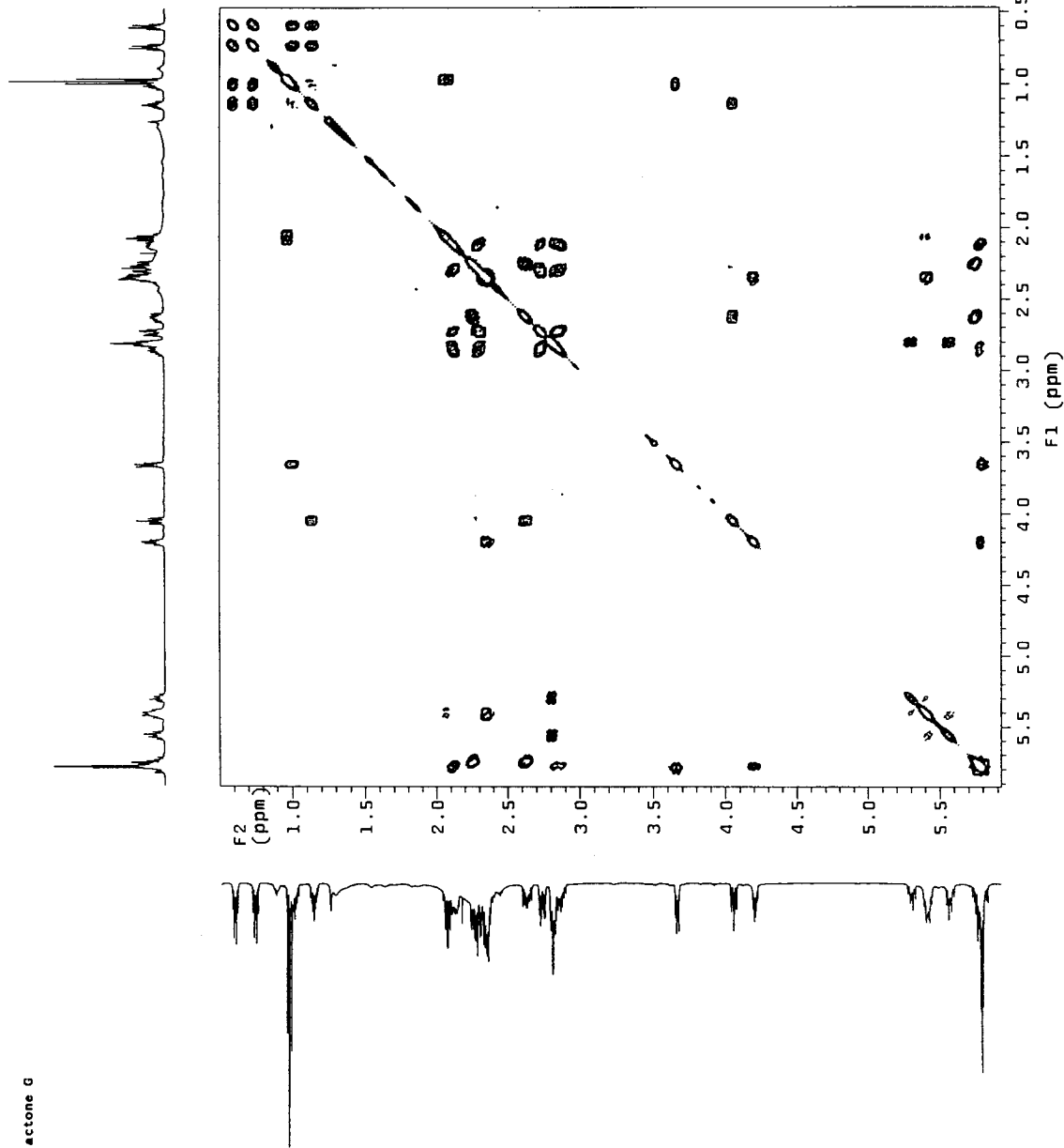


Fig. 3-37. Proton COSY spectrum of solandelactone G(91-10-G).

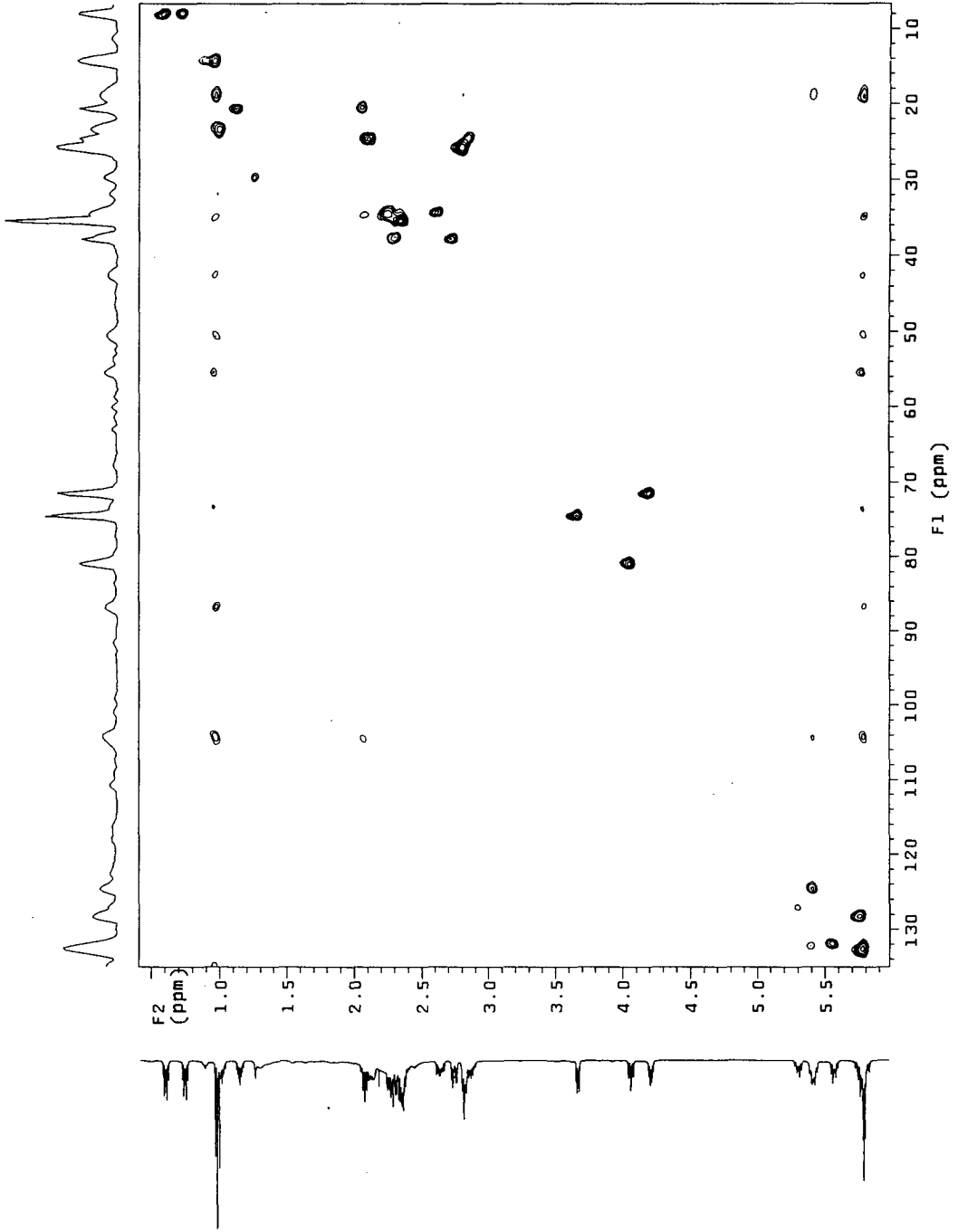


Fig. 3-38. HMOC spectrum of solandelactone G(91-10-G).

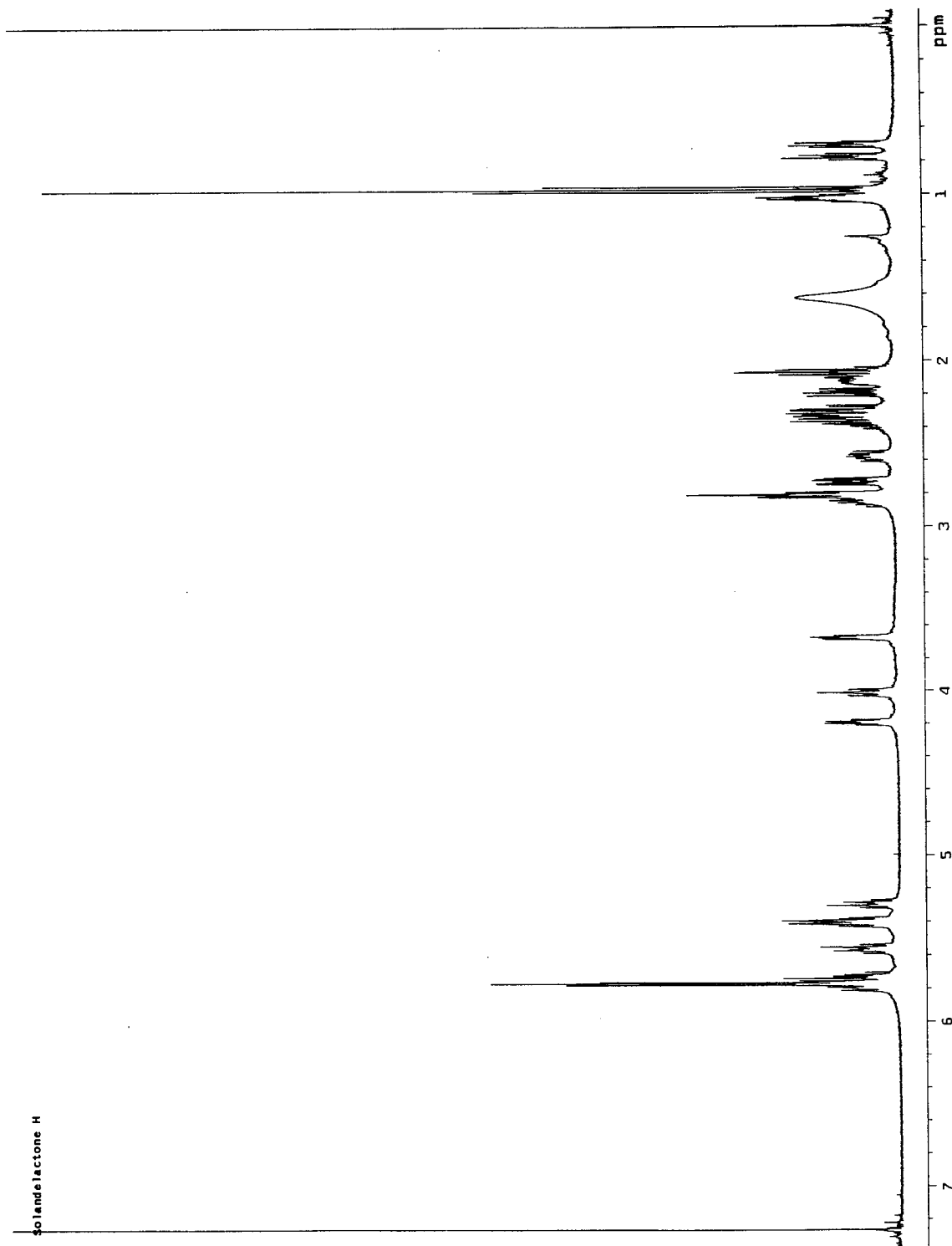


Fig. 3-39. Proton NMR spectrum of solandelactone H(91-10-H).

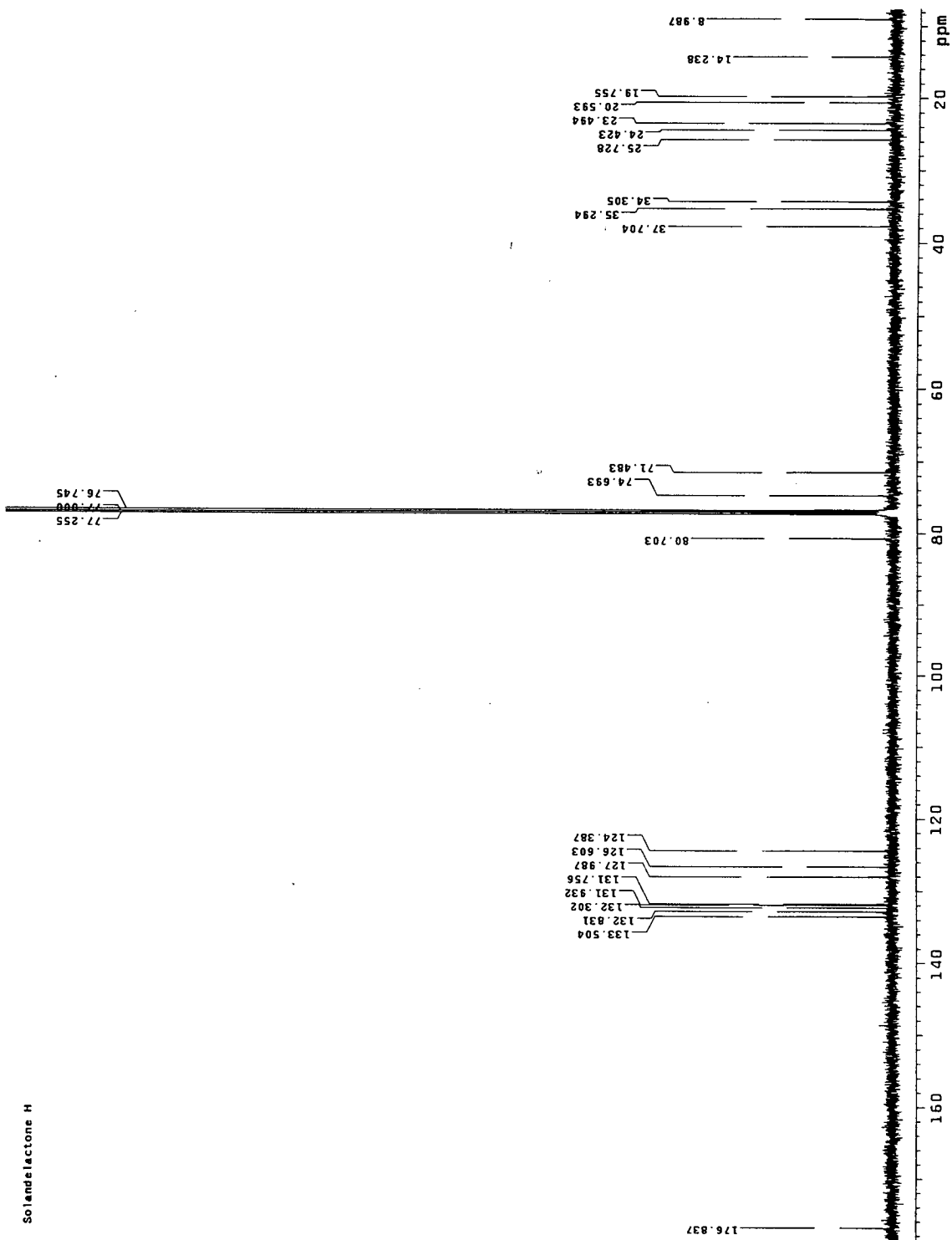


Fig. 3-40. Carbon NMR spectrum of solandelactone H(91-10-H).

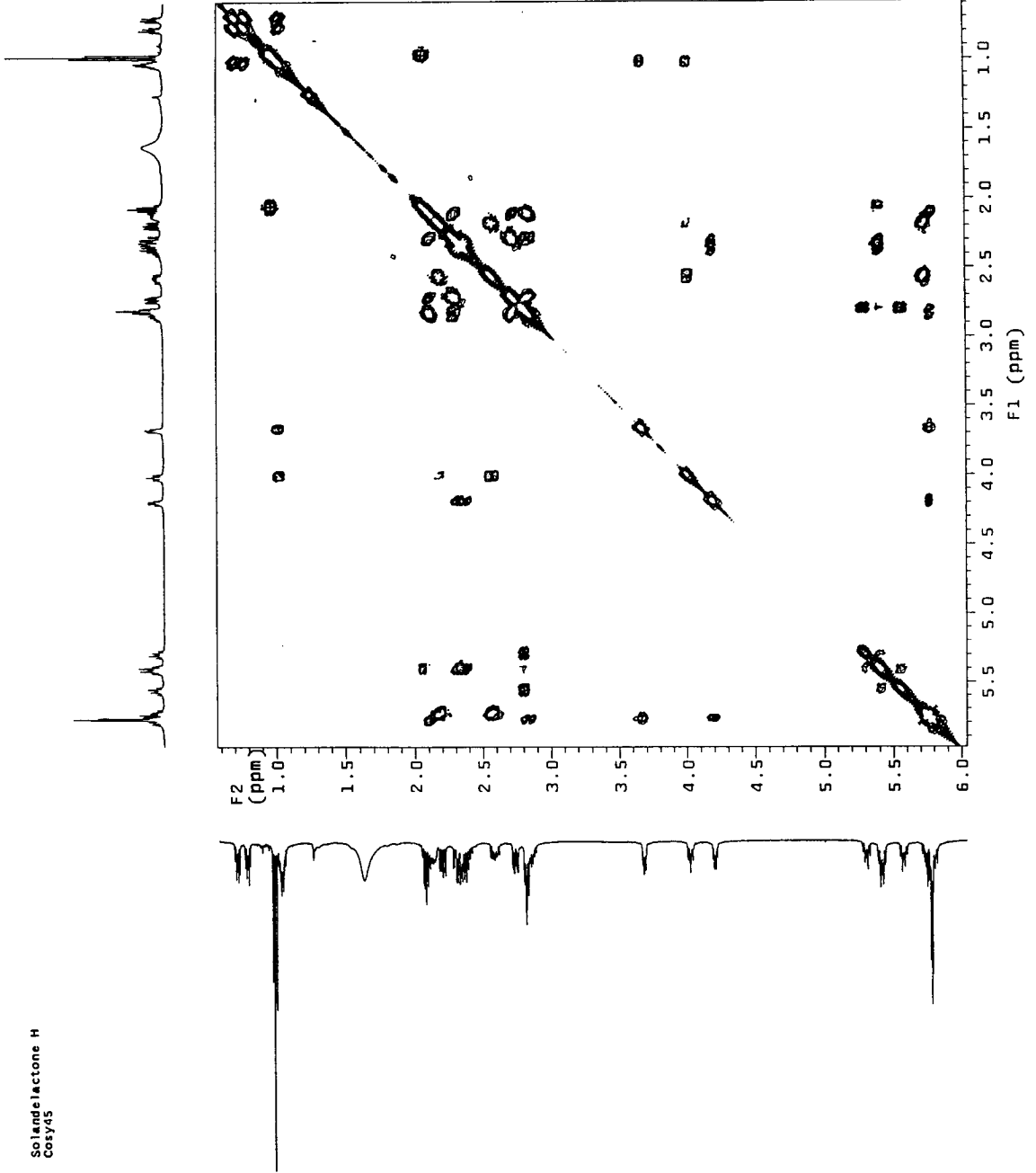


Fig. 3-41. Proton COSY spectrum of solandelactone H(91-10-H).

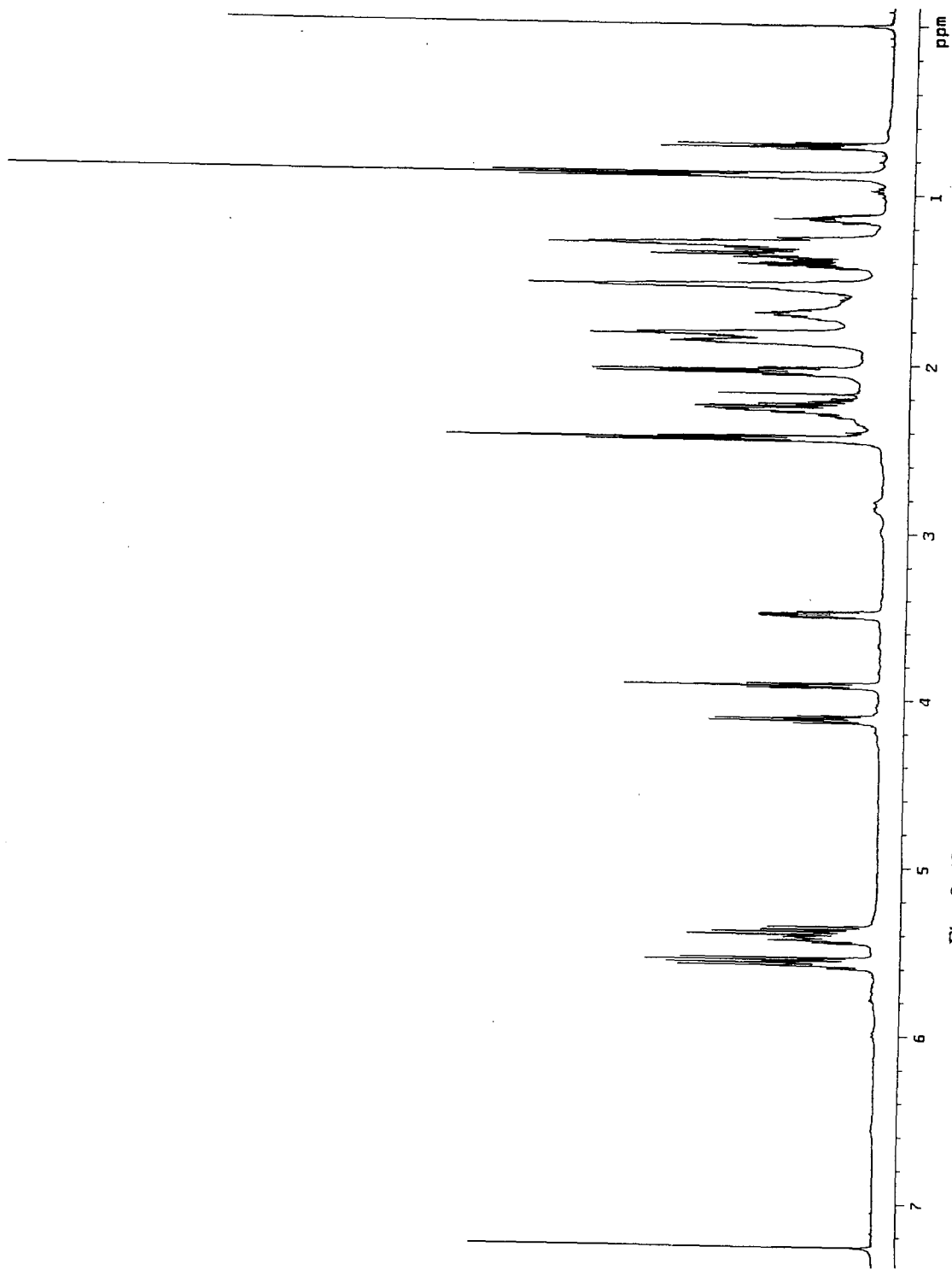


Fig. 3-42. Proton NMR spectrum of solandelactone I (91-10-I).

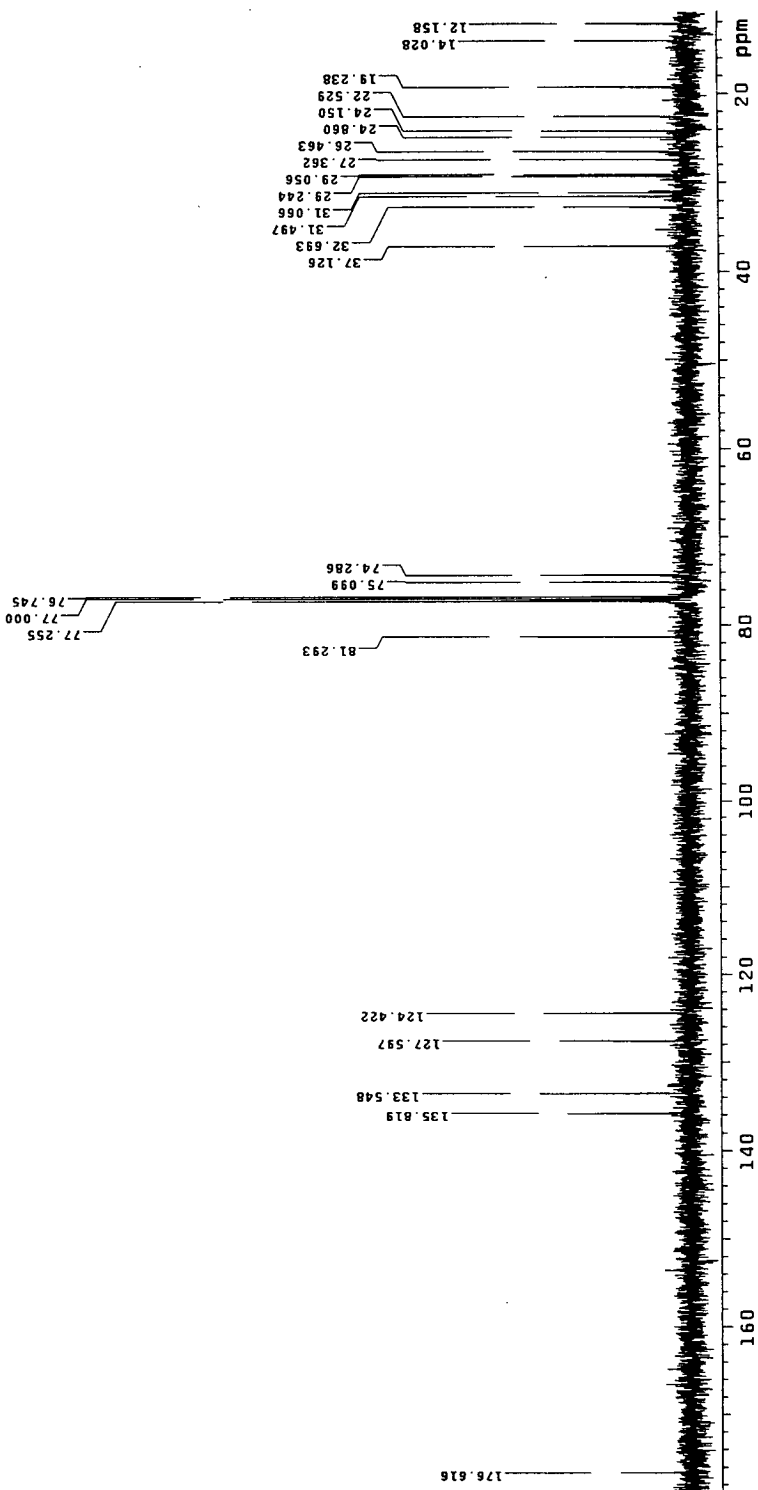


Fig. 3-43. Carbon NMR spectrum of solandelactone I (91-10-I).

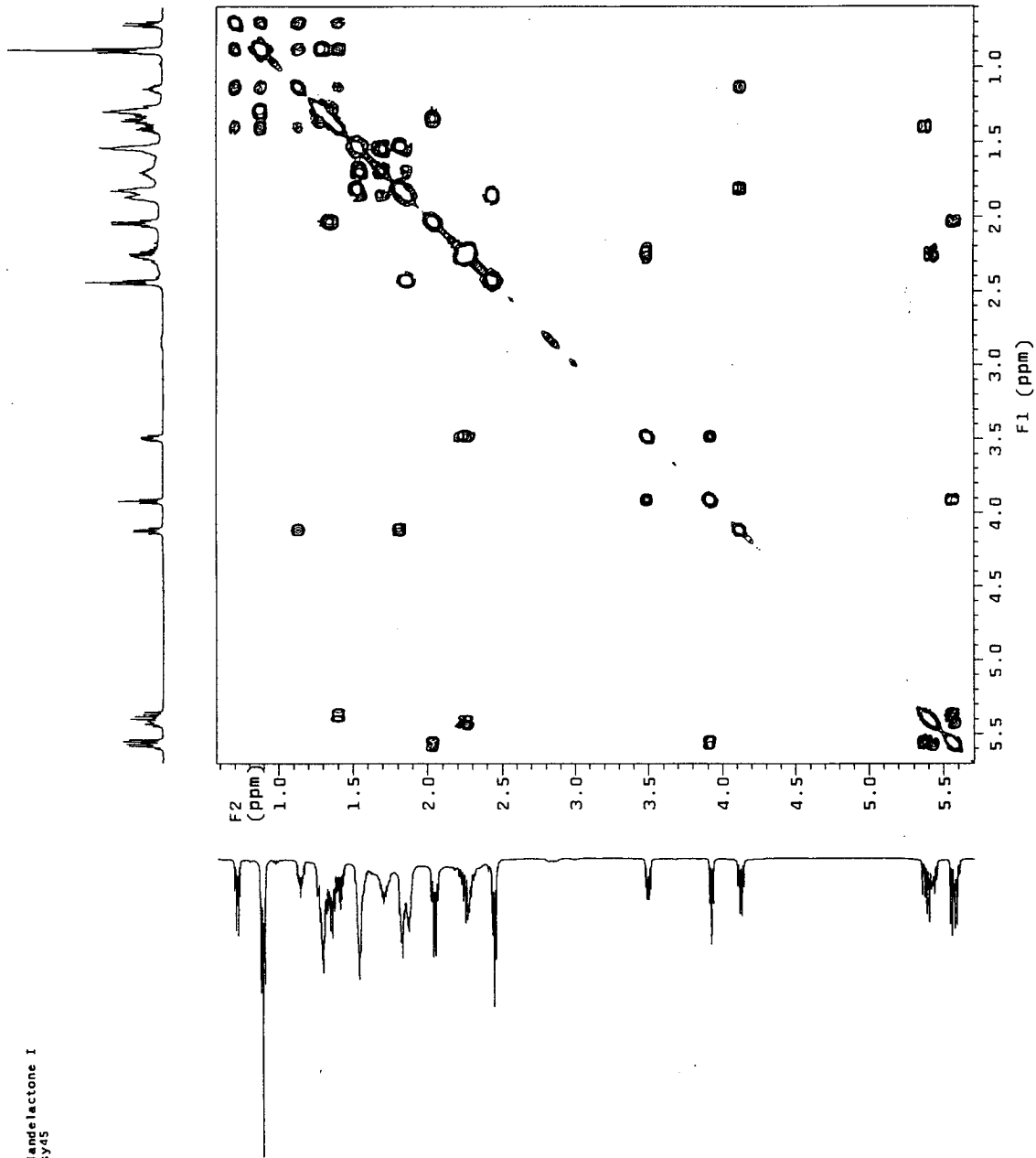


Fig. 3-44. Proton COSY spectrum of solandelactone I(91-10-1).

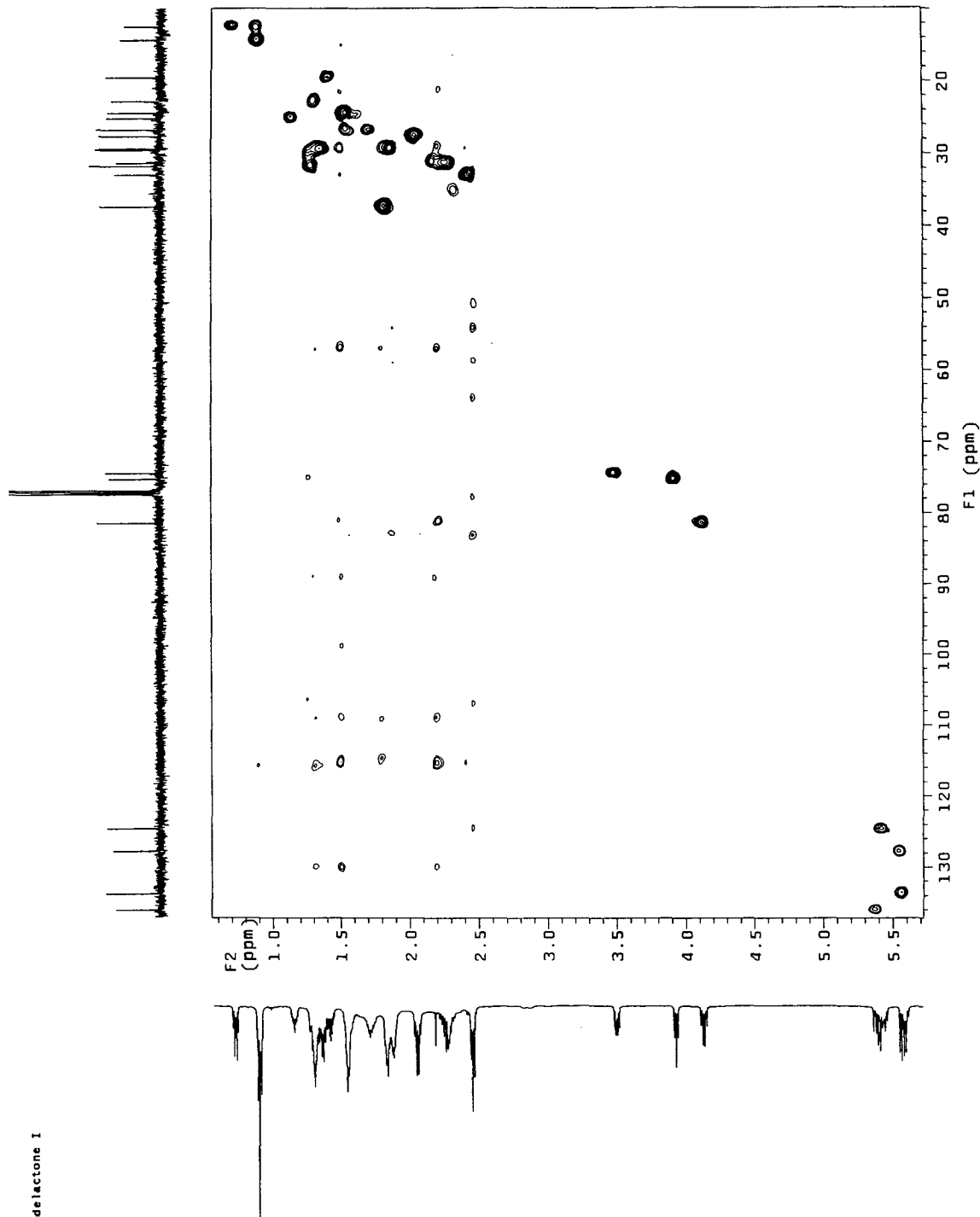


Fig. 3-45. HMQC spectrum of solandelactone I(91-10-I).

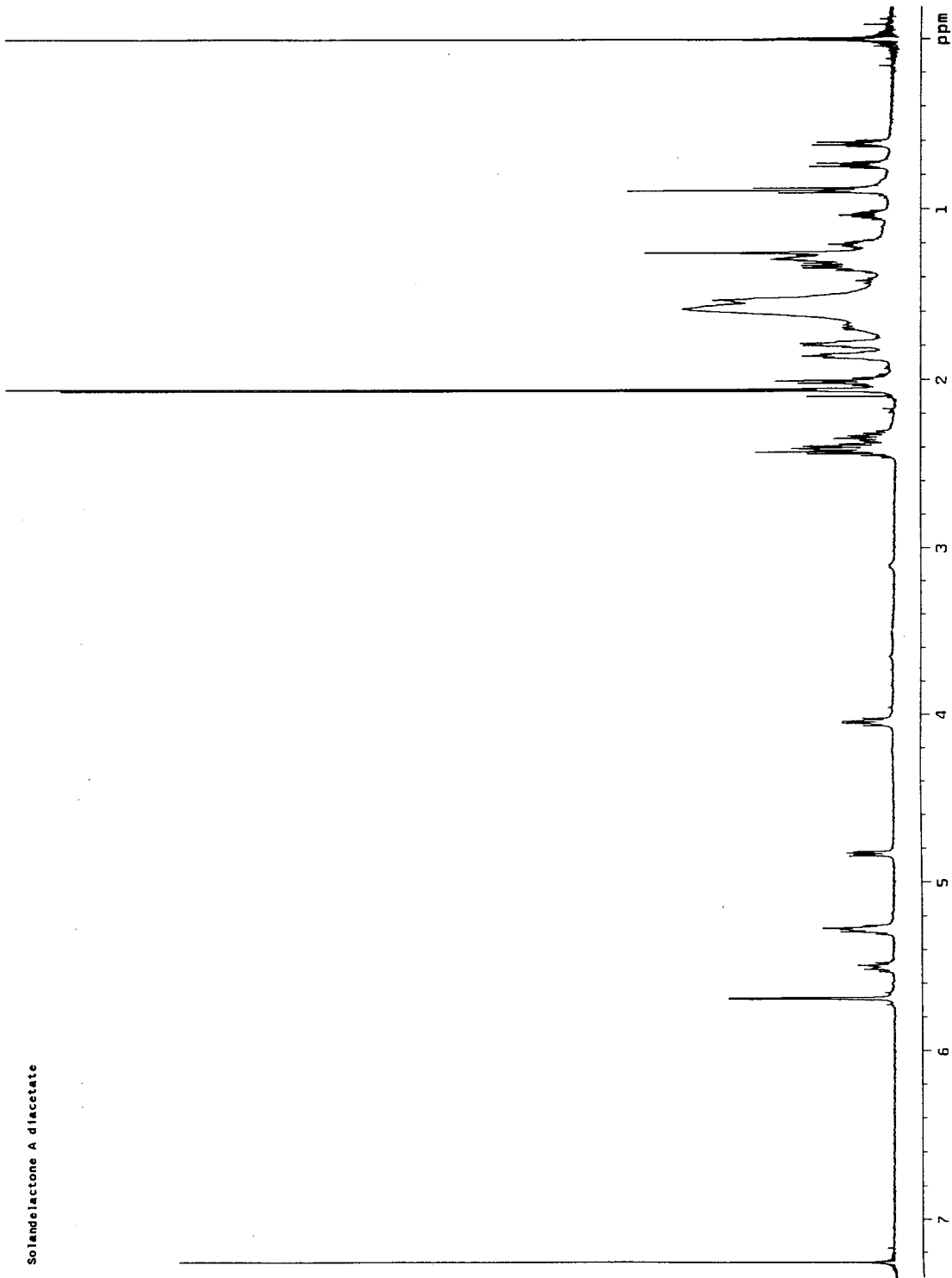


Fig. 3-46. Proton NMR spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).

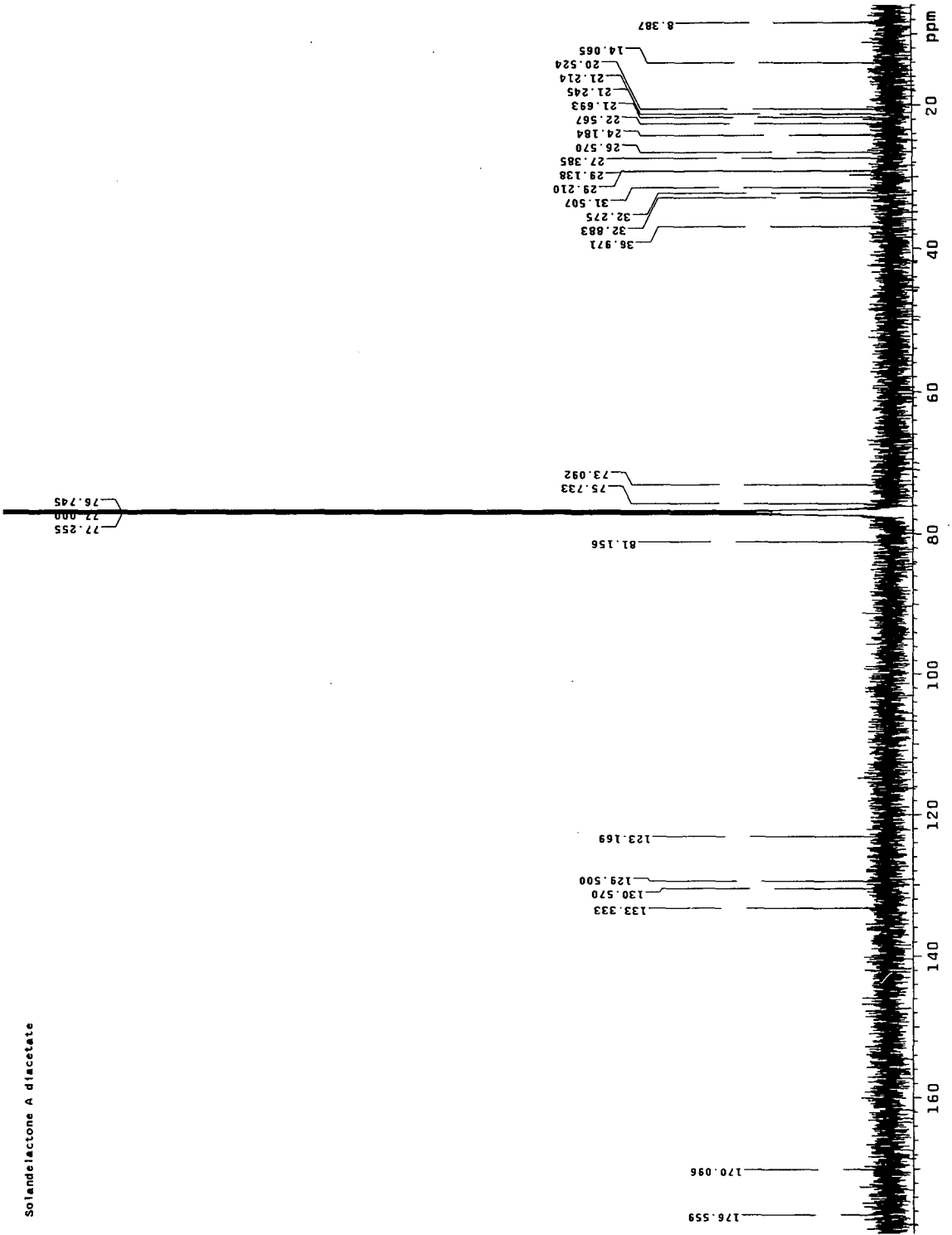


Fig. 3-47. Carbon NMR spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).

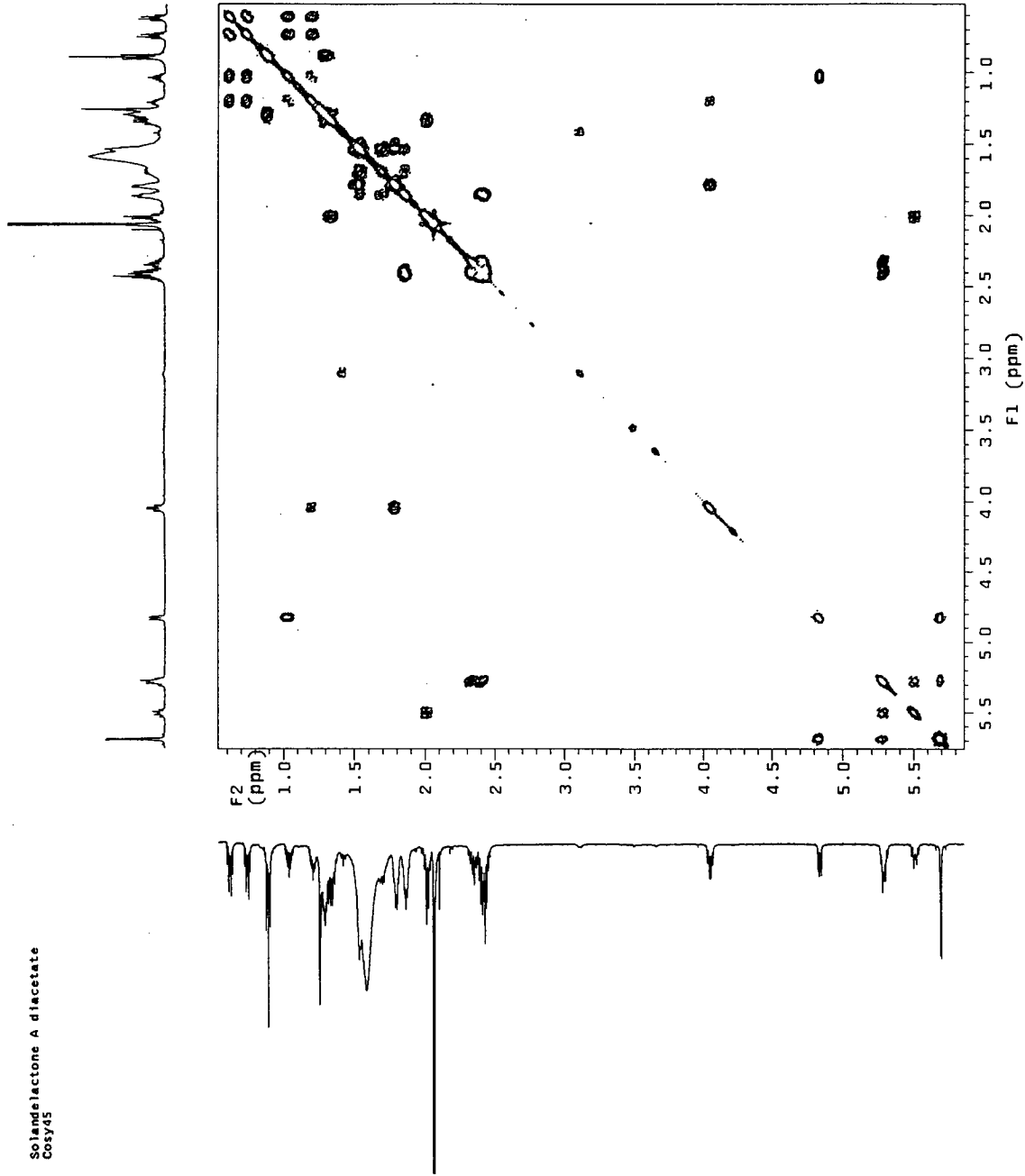


Fig. 3-48. Proton COSY spectrum of solandelactone A diacetate(91-10-J).

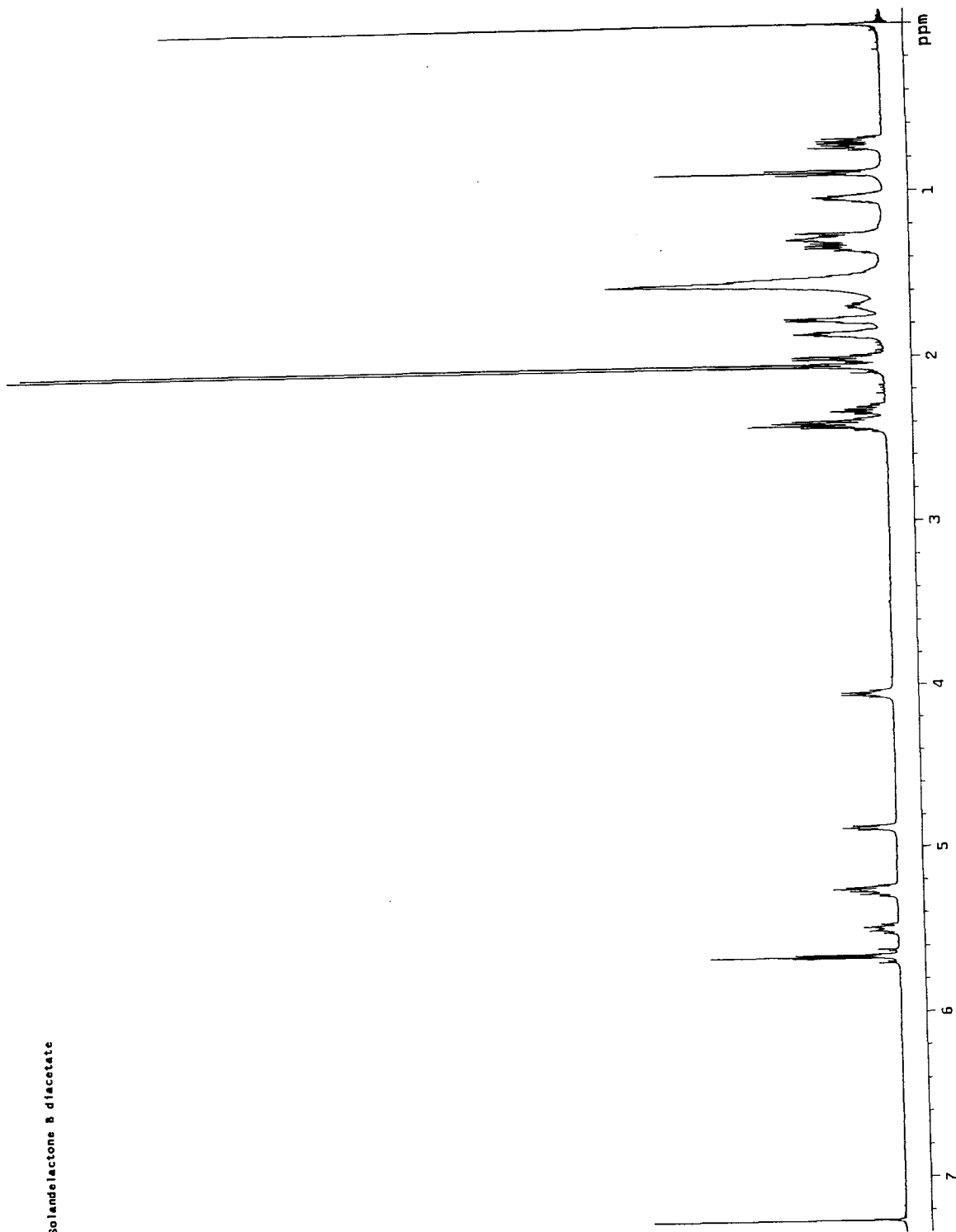


Fig. 3-49. Proton NMR spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).

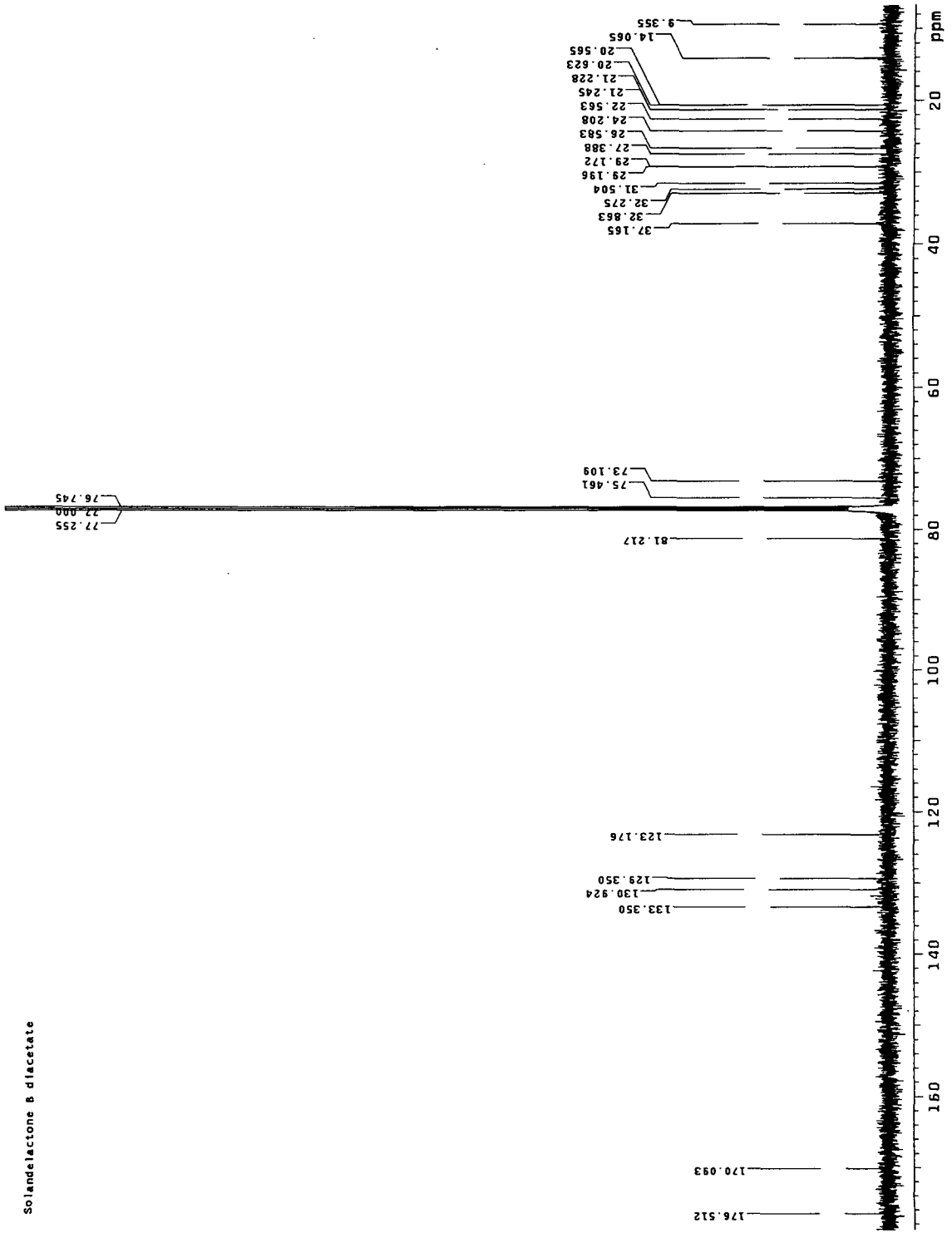


Fig. 3-50. Carbon NMR spectrum of solandelactone B diacetate(9I-10-K).

Solandelactone B diacetate
Cosy45

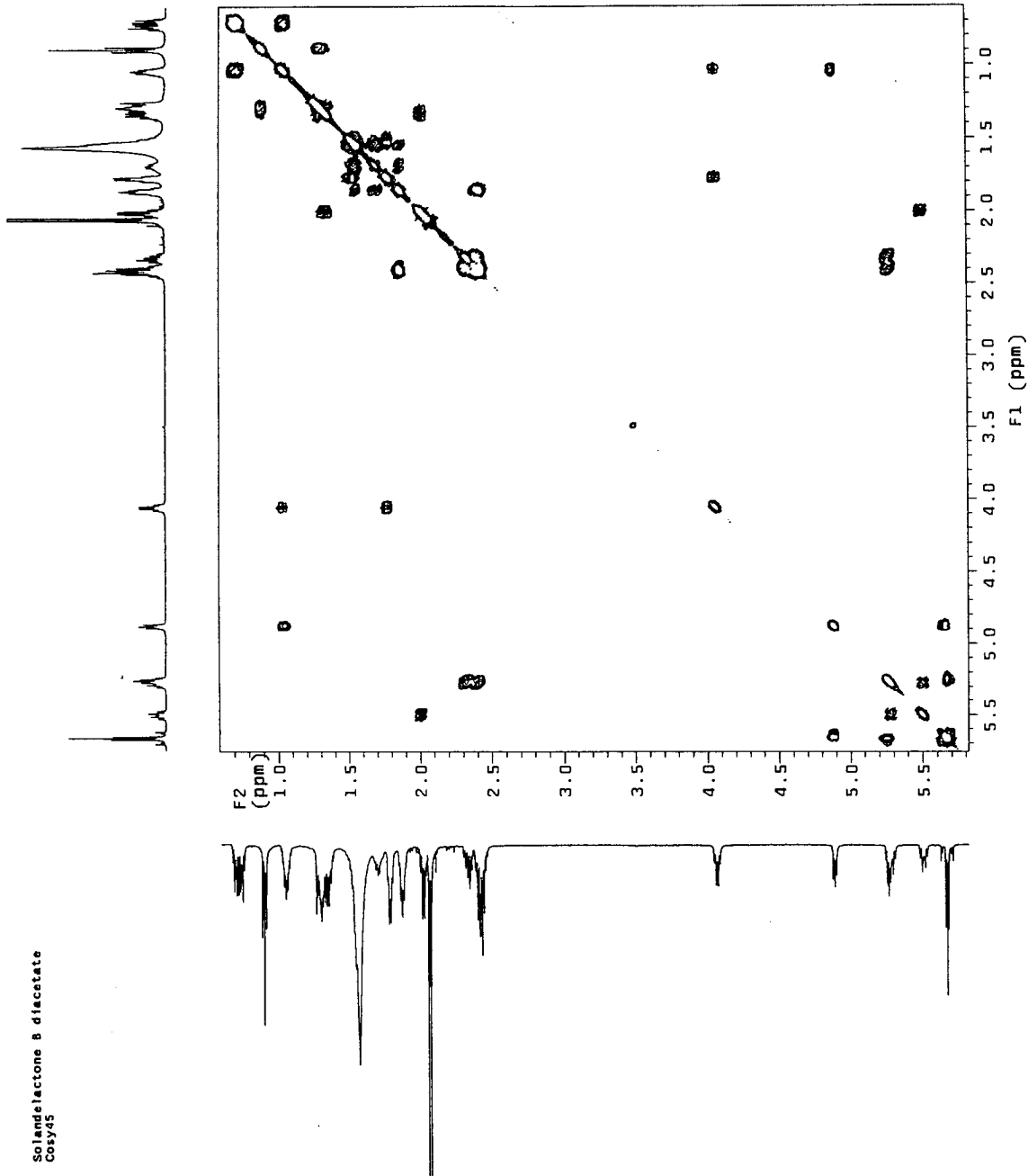


Fig. 3-51. Proton COSY spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).

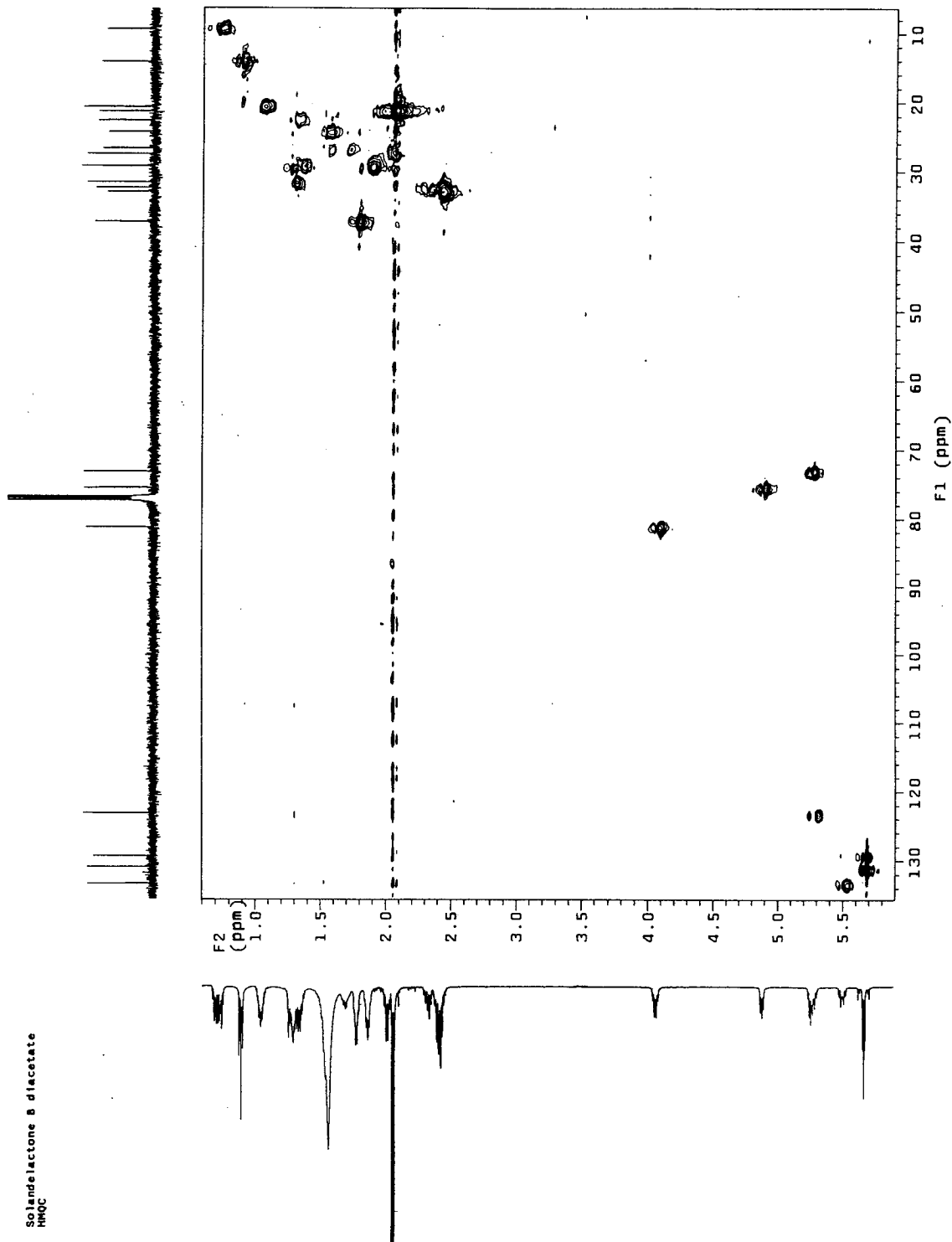


Fig. 3-52. HMOC spectrum of solandelactone B diacetate(91-10-K).

Solandelactone E diacetate

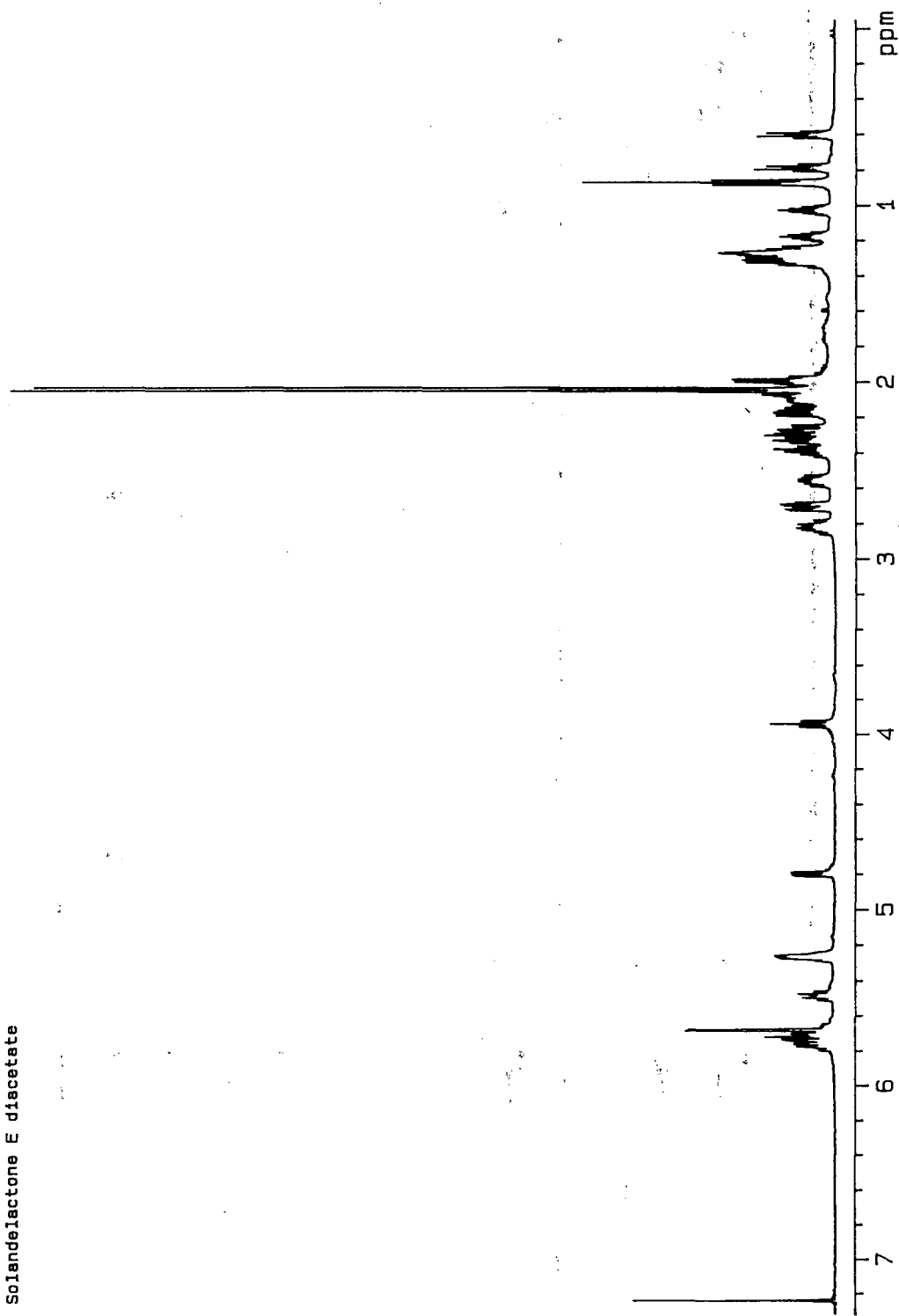


Fig. 3-53. Proton NMR spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).

Solandelactone E diacetate

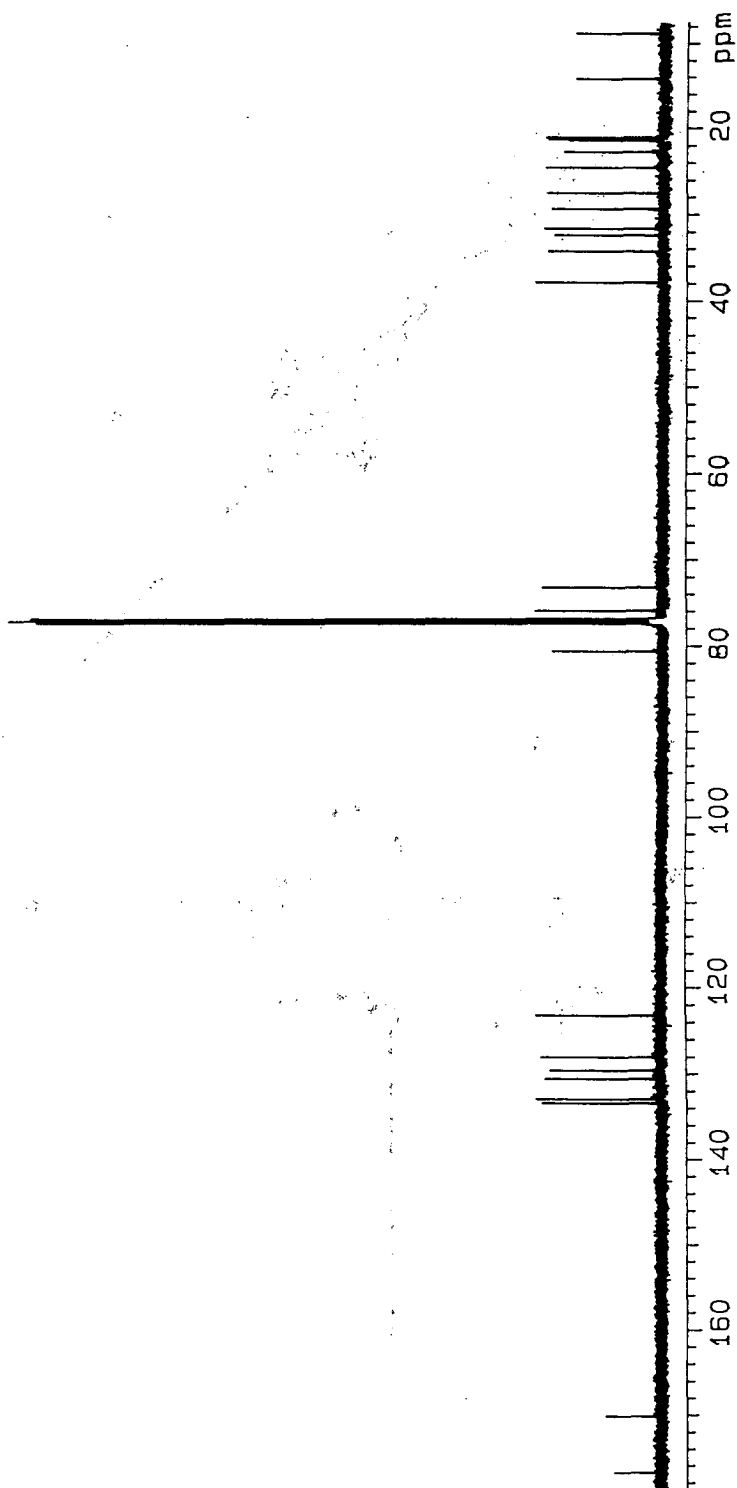


Fig. 3-54. Carbon NMR spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).

Solandelactone E diacetate
COSY45

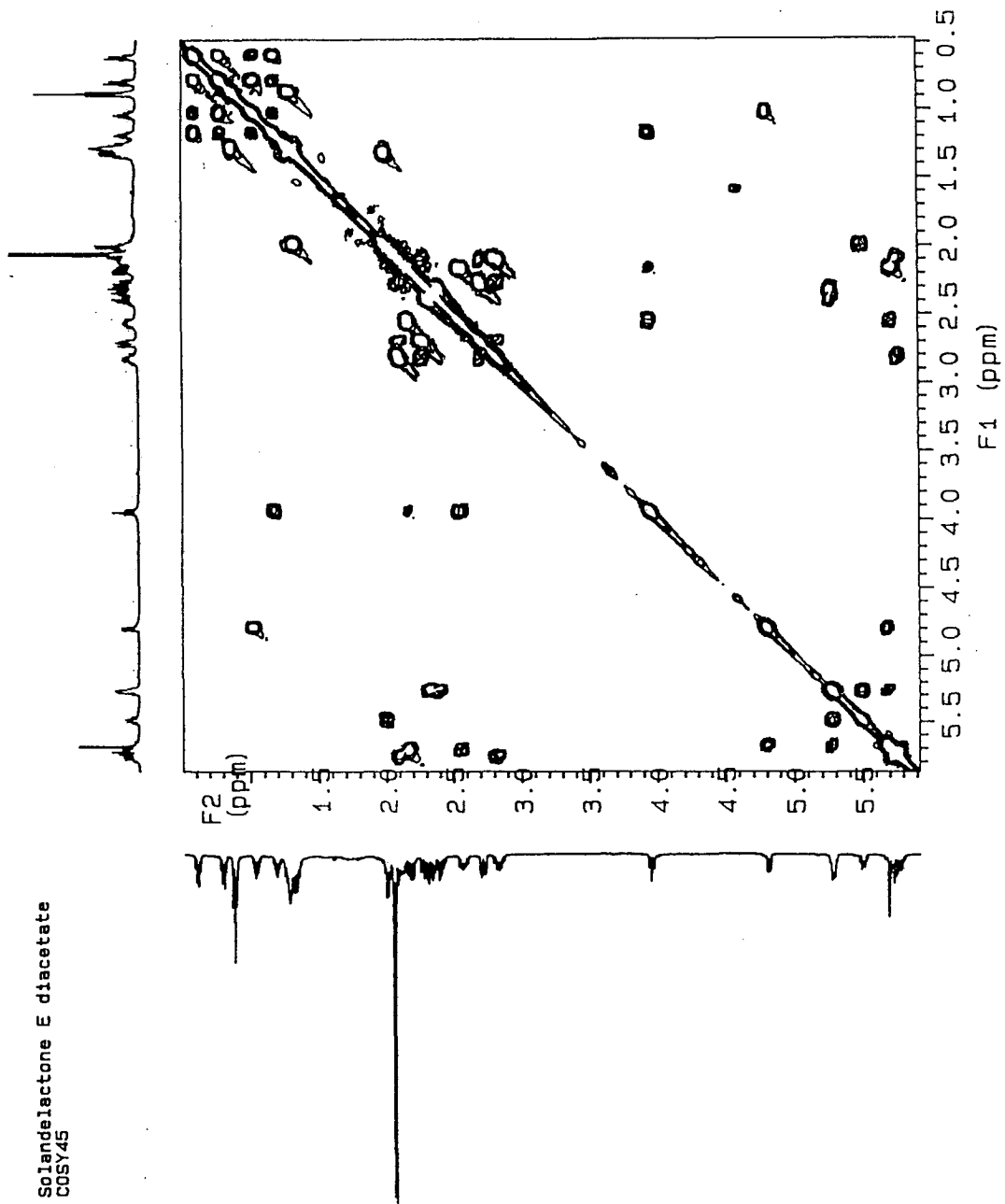


Fig. 3-55. Proton COSY spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).

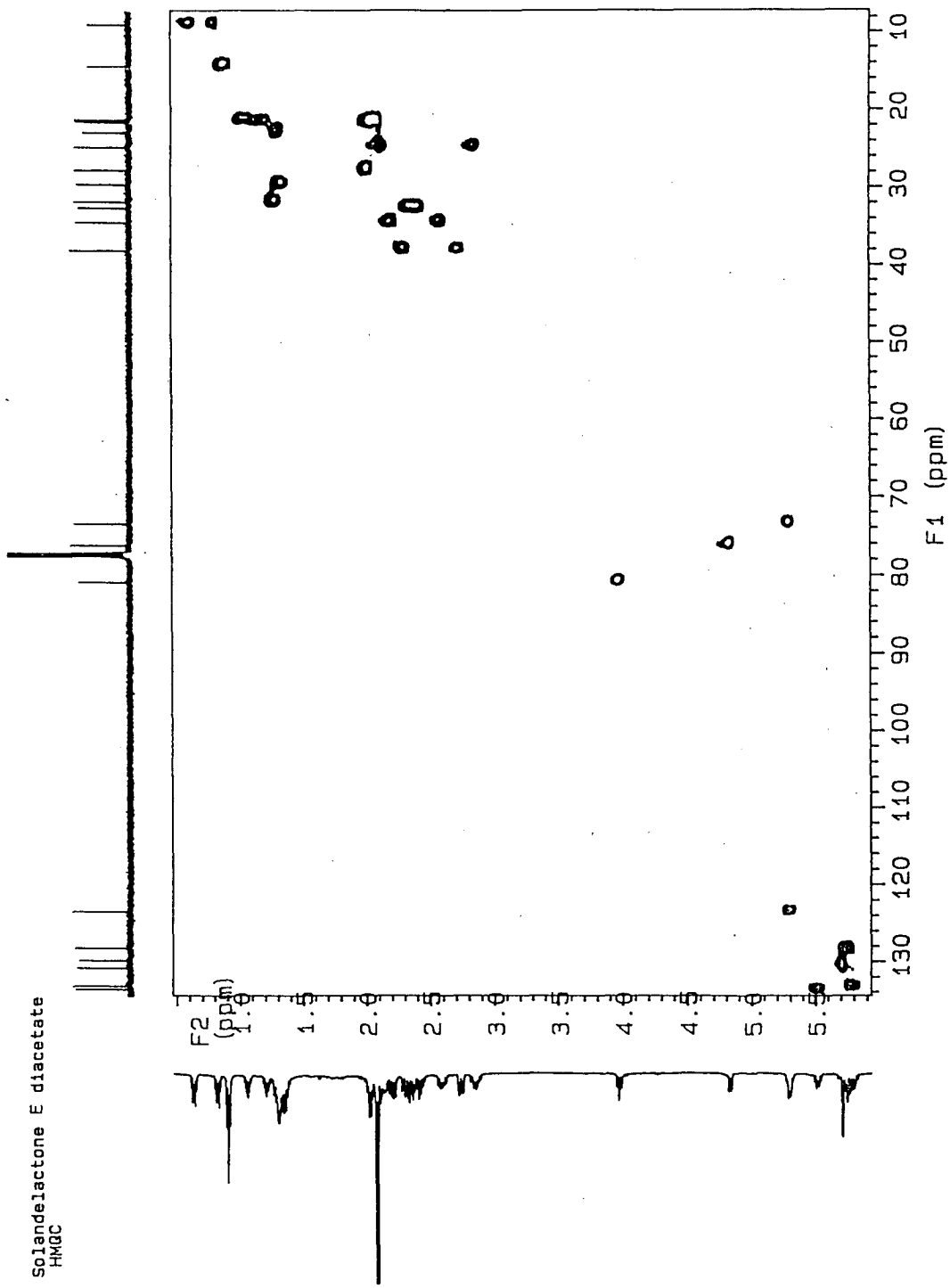


Fig. 3-56. HMQC spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).

Solandelactone E diacetate
NOESY

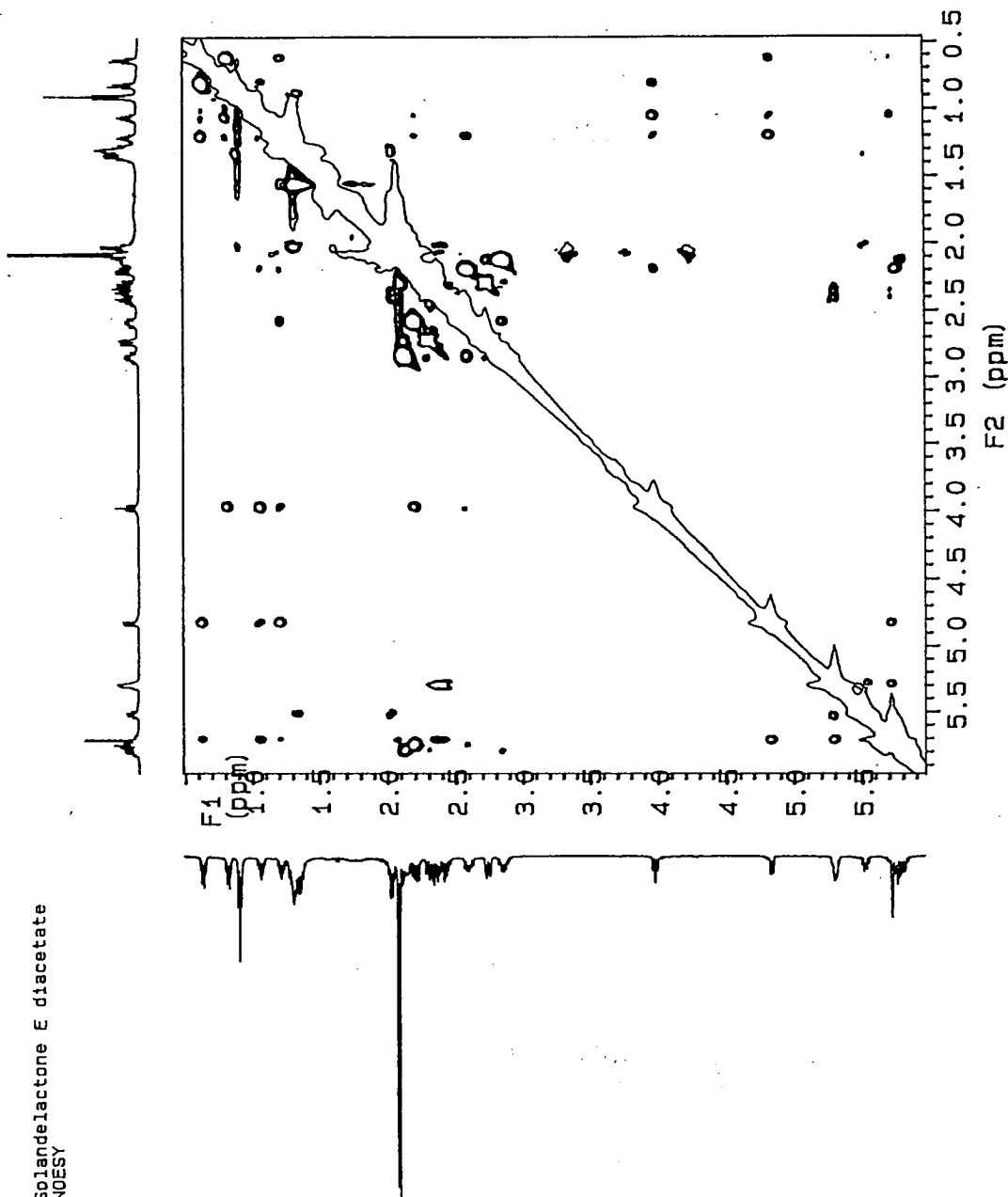


Fig. 3-57. NOESY spectrum of solandelactone E diacetate(91-10-L).

Solandelactone F diacetate

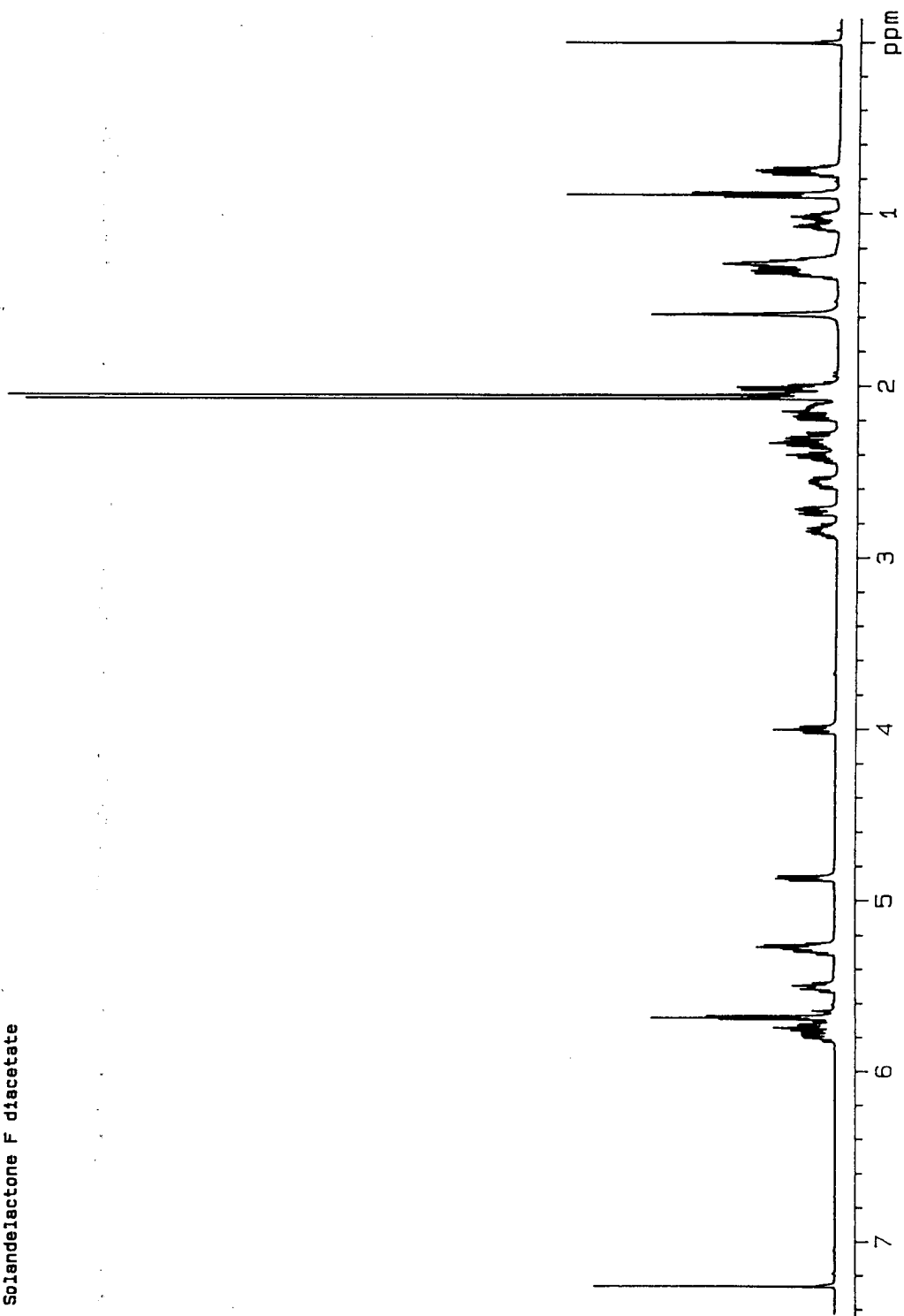


Fig. 3-58. Proton NMR spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).

Solandelactone F diacetate

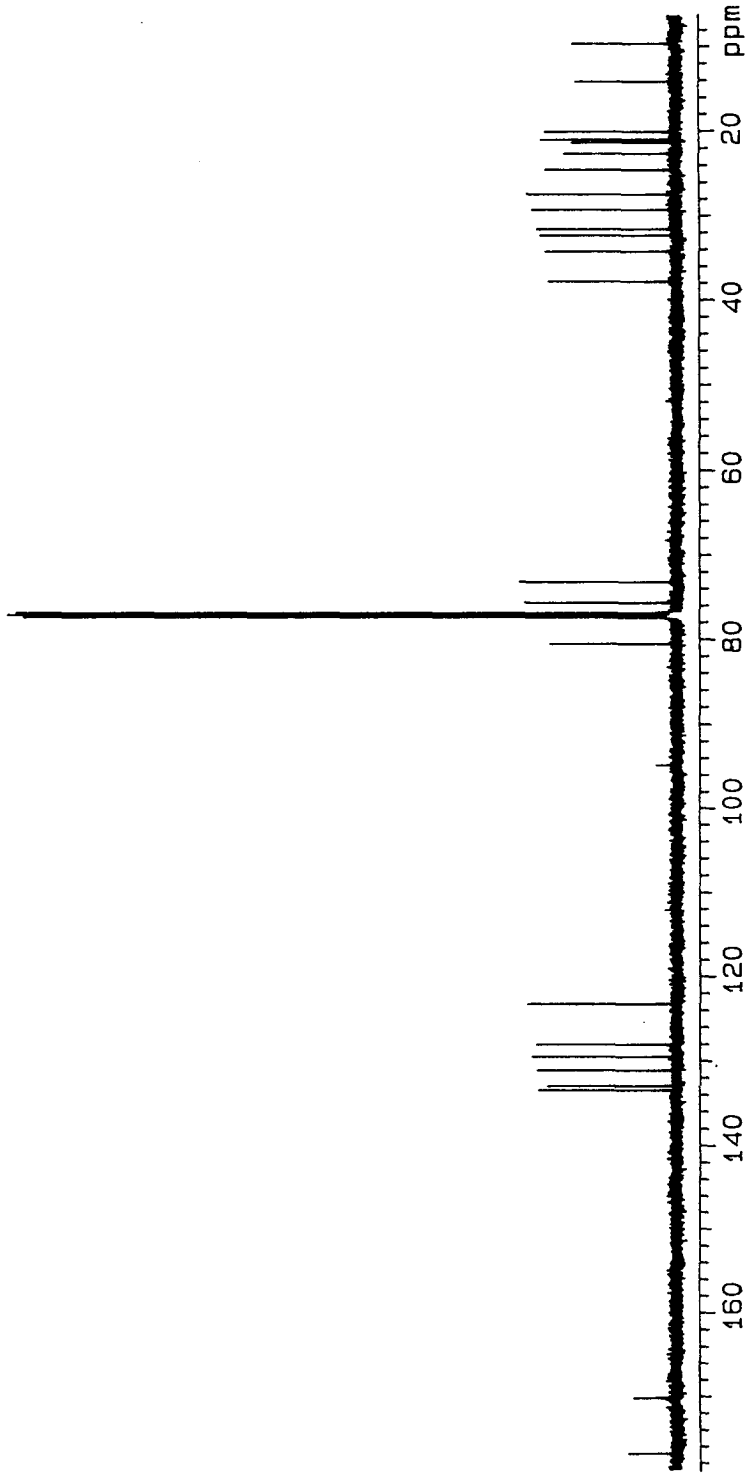


Fig. 3-59. Carbon NMR spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).

Solandelactone F diacetate
COSY 45

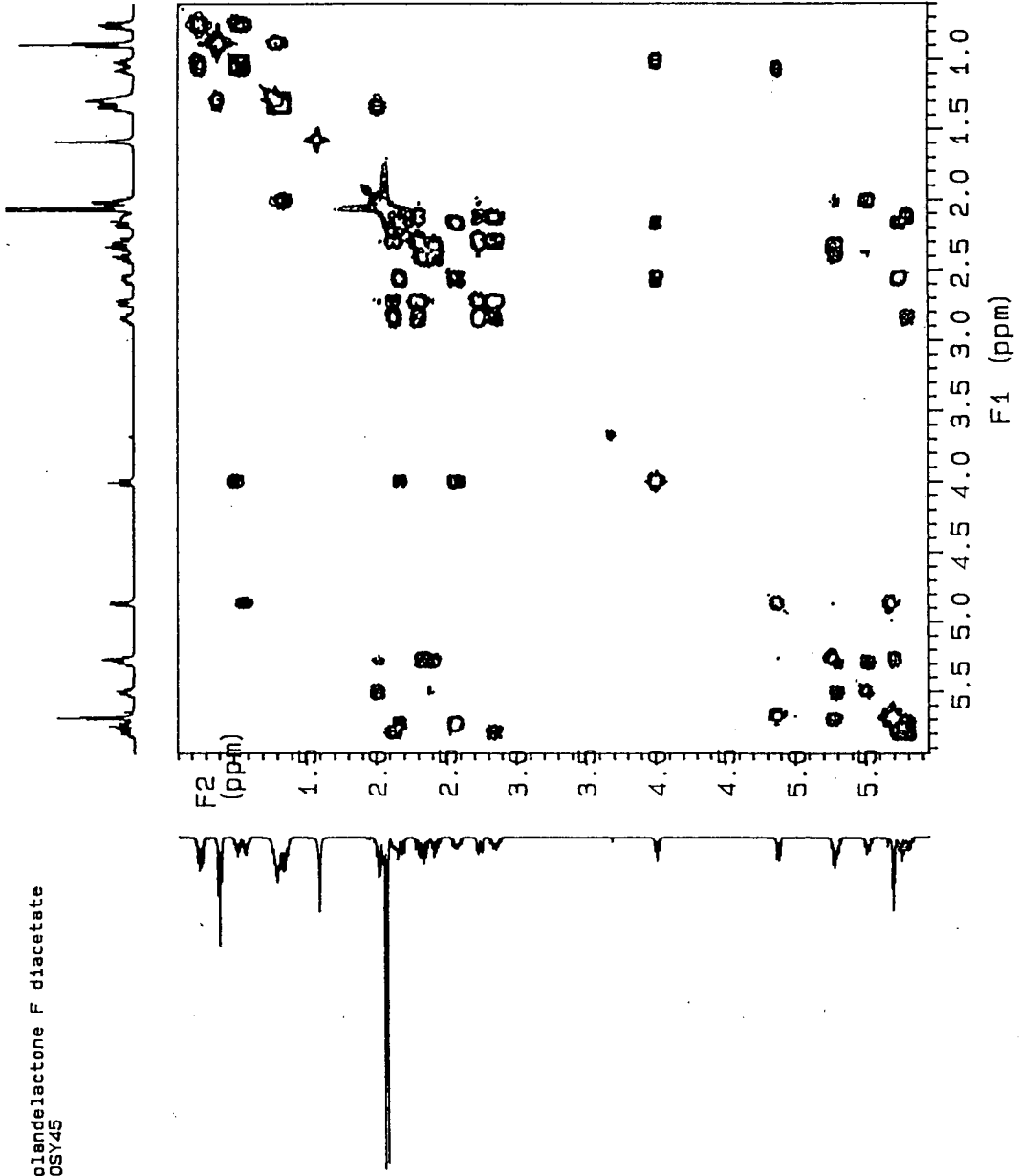


Fig. 3-60. Proton COSY spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).

Solandelactone F diacetate
HMQC

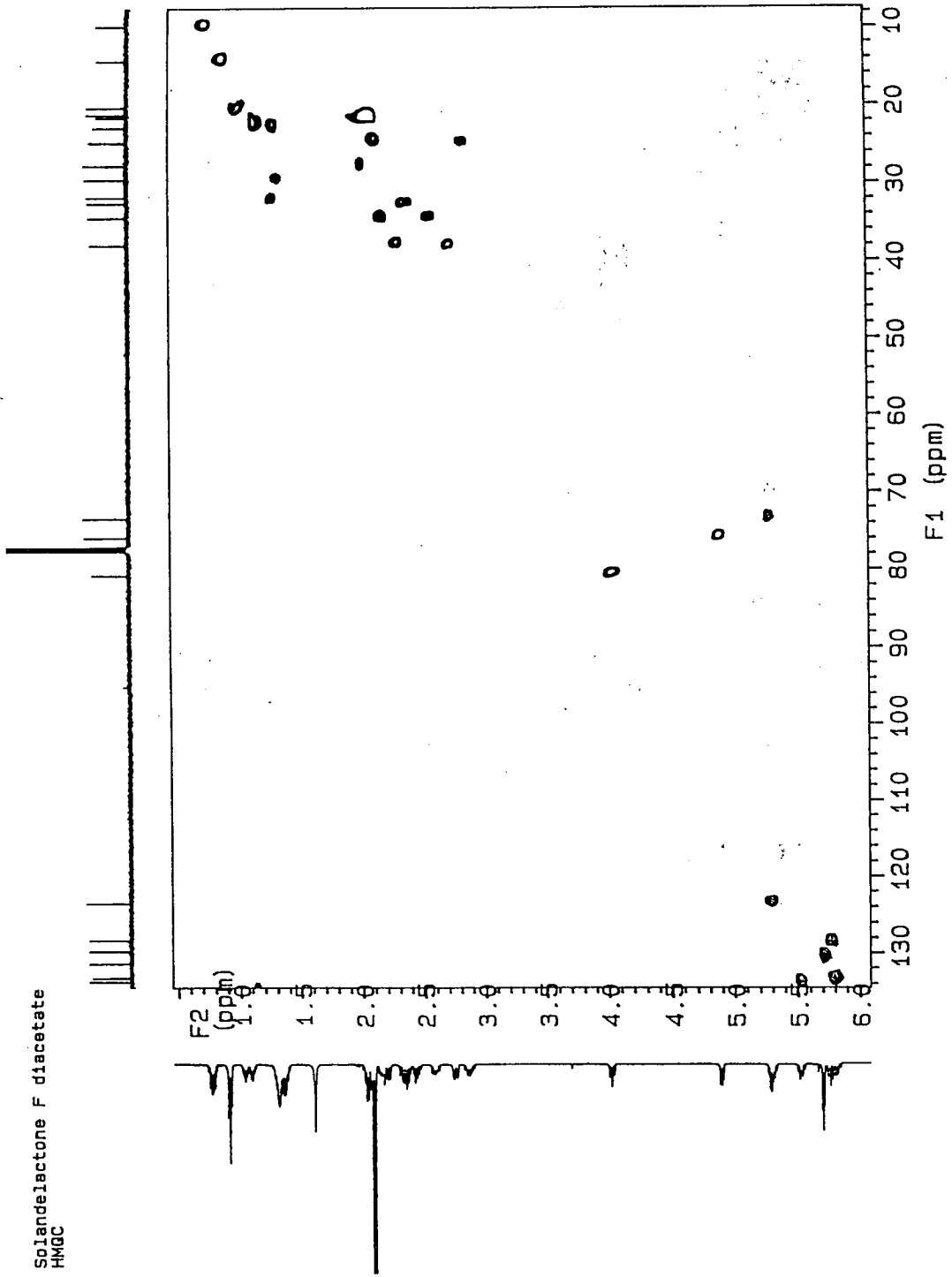


Fig. 3-61. HMQC spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).

Solandelactone F diacetate
NOESY

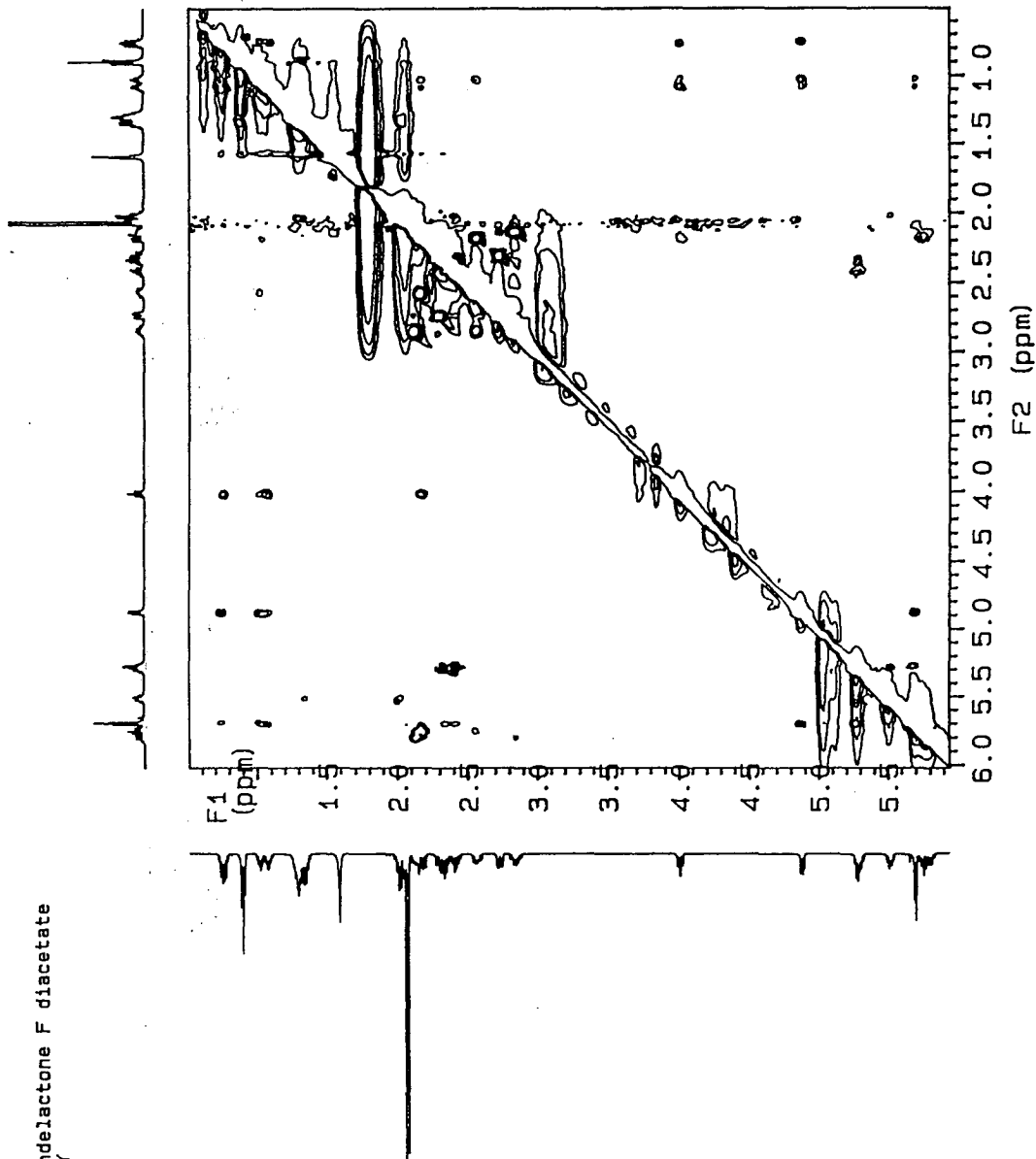


Fig. 3-62. NOESY spectrum of solandelactone F diacetate(91-10-M).

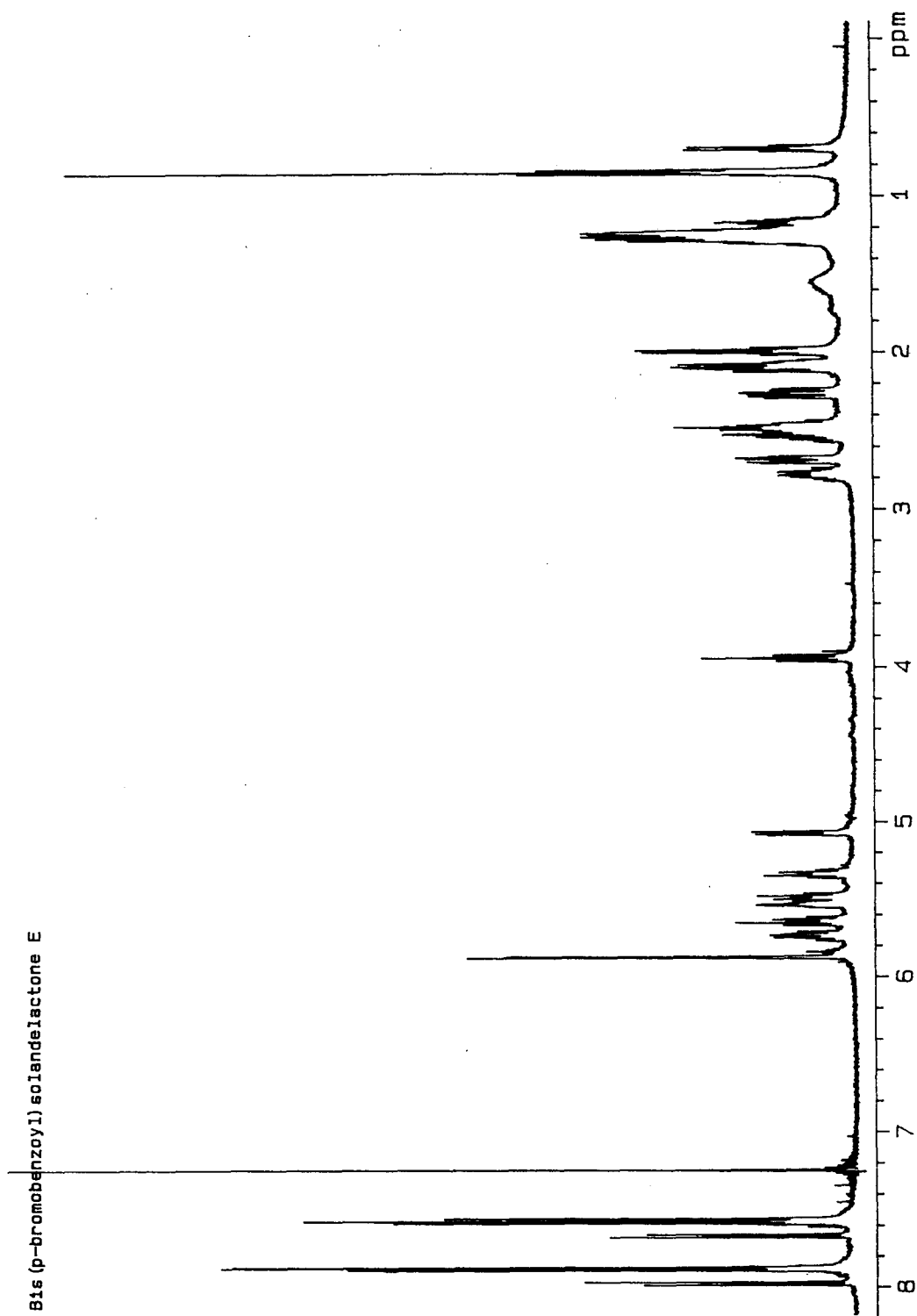


Fig. 3-63. Proton NMR spectrum of bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(91-10-N).

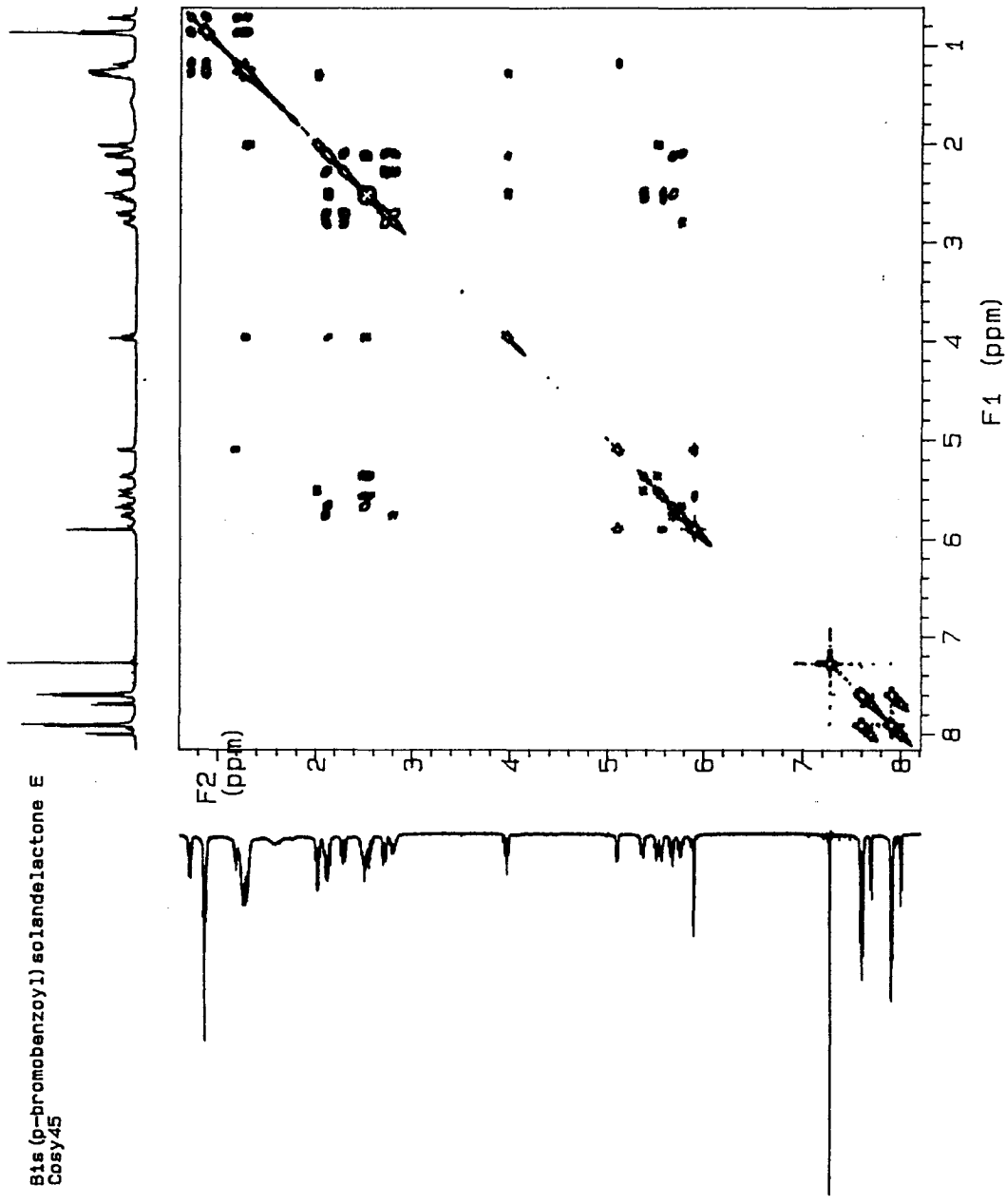


Fig. 3-64. Proton COSY spectrum of bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(91-10-N).

Bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E
Noesy

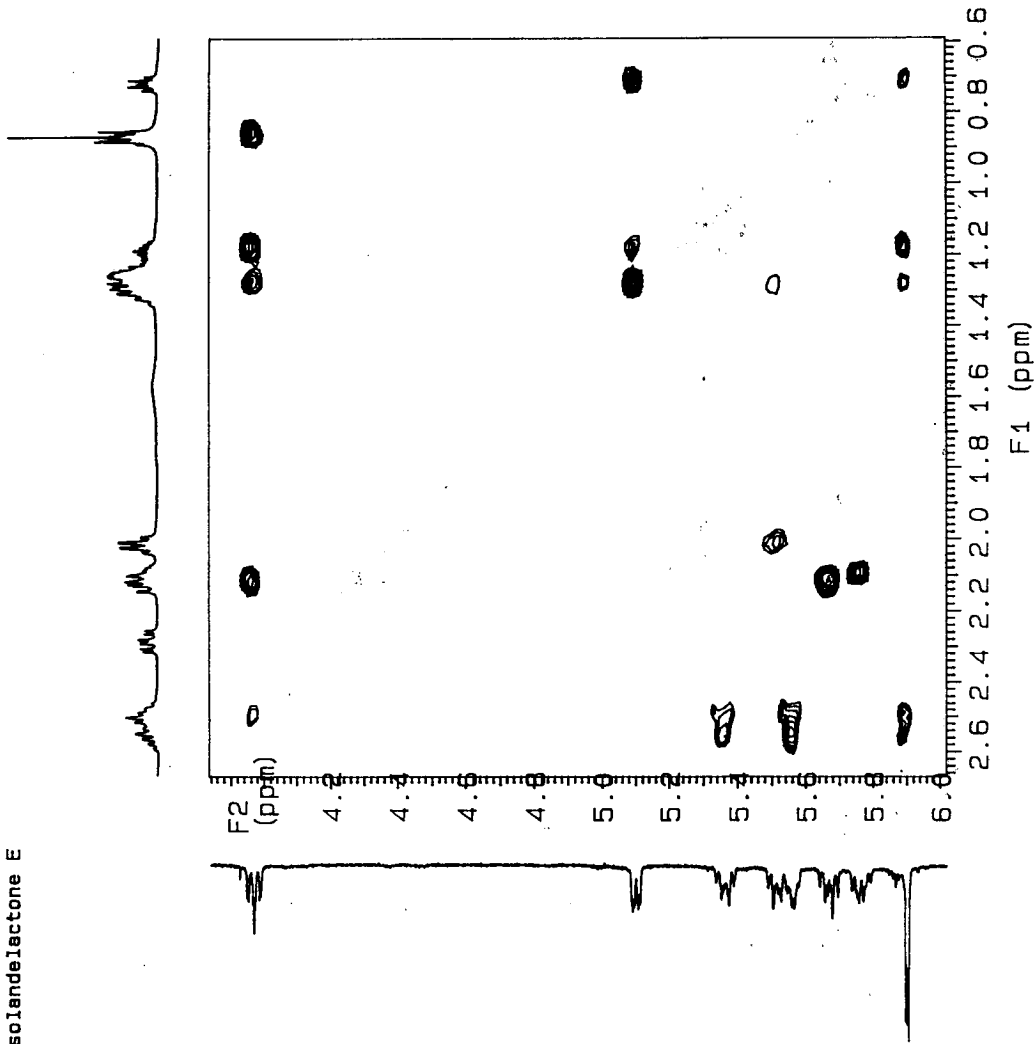


Fig. 3-65. NOESY spectrum of bis(*p*-bromobenzoyl)solandelactone E(91-10-N).

Bis (p-bromobenzoyl) solandelactone F

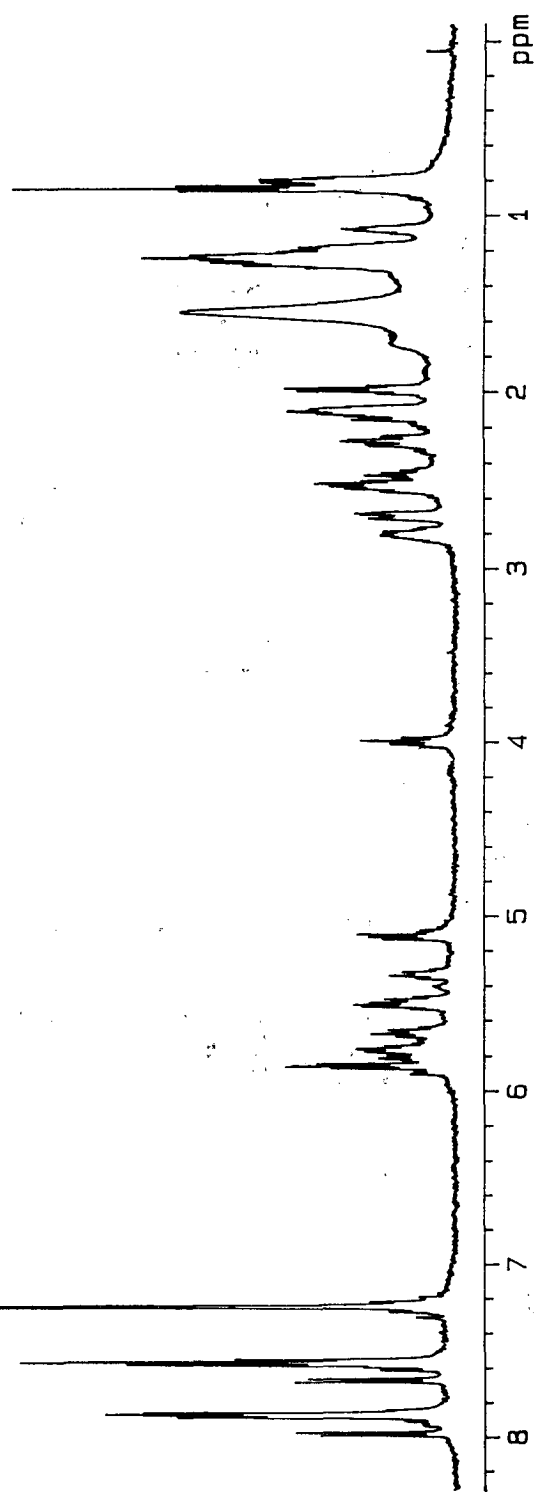


Fig. 3-66. Proton NMR spectrum of bis(p-bromobenzoyl)sandelactone F(91-10-Q).

Bis (p-bromobenzoyl) solandelactone F
Cosy 45

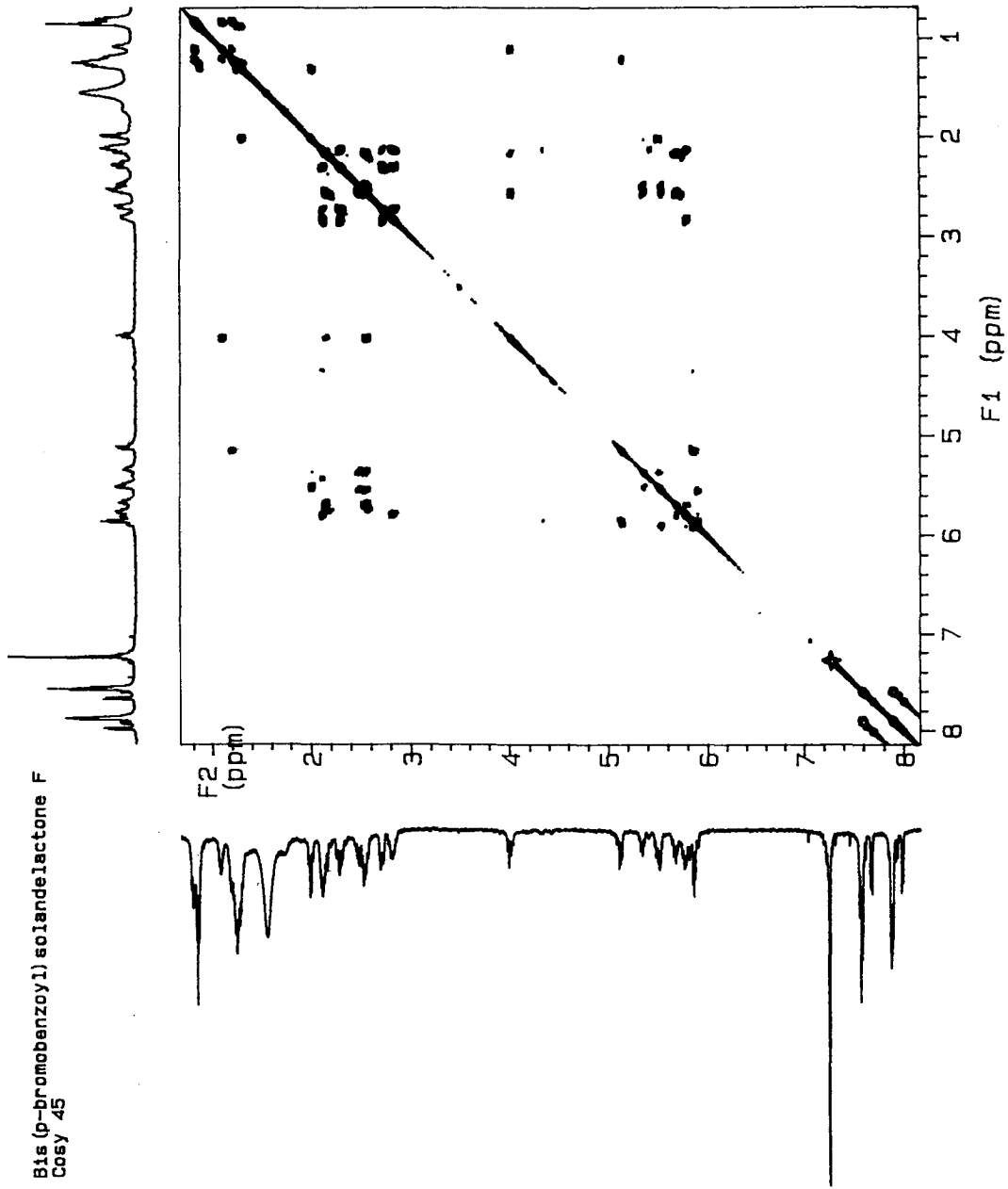


Fig. 3-67. Proton COSY spectrum of bis(p-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-Q).

Bis (p-bromobenzoyl) solandelactone F
Noesy

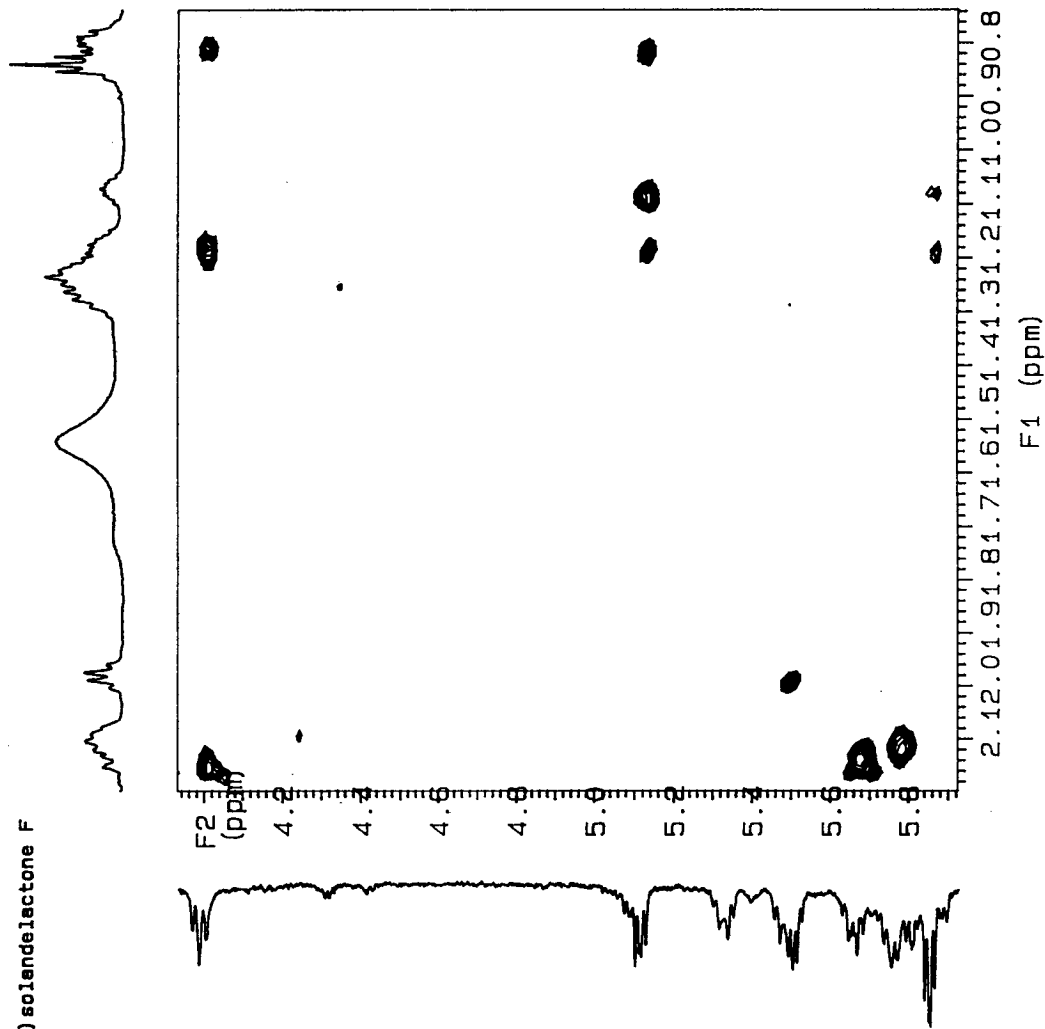


Fig. 3-68. NOESY spectrum of bis(p-bromobenzoyl)solandelactone F(91-10-Q).

Bis (menthoxy carbonyl) solandelactone F

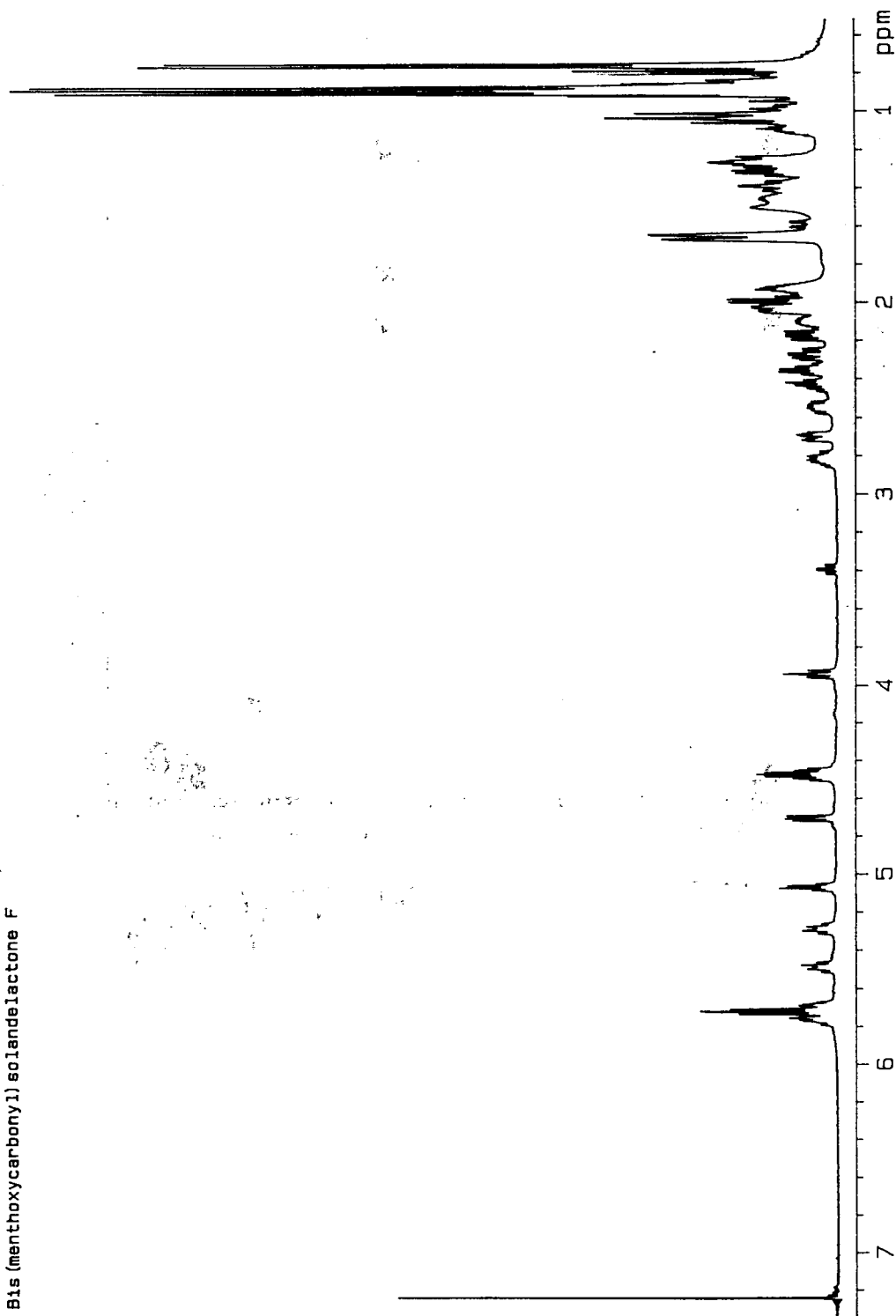


Fig. 3-69. Proton NMR spectrum of bis(menthoxy carbonyl)solandelctone F(91-10-T).

Bis (menthoxy carbonyl) solandelactone F
Casy 45

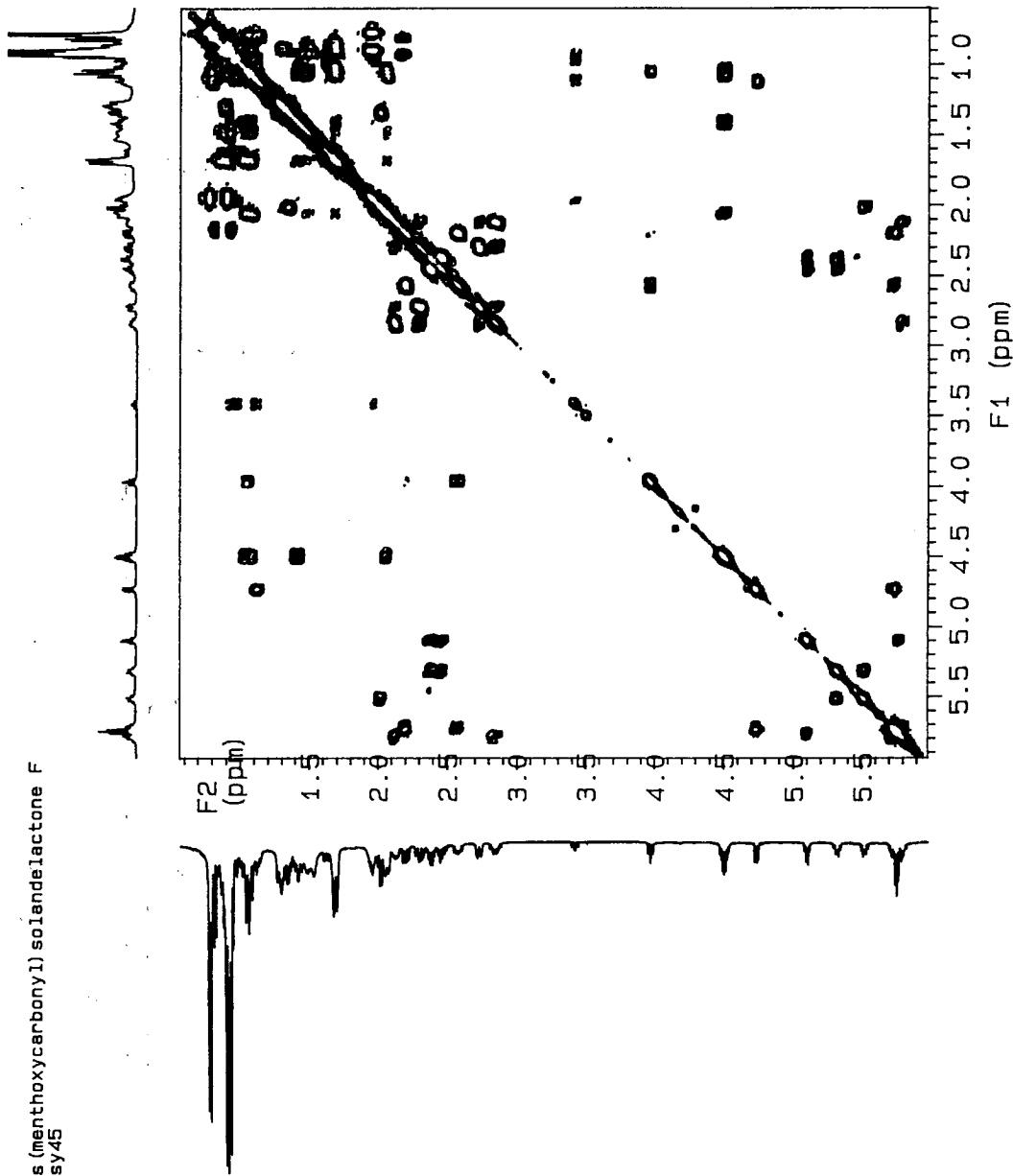


Fig. 3-70. Proton COSY spectrum of bis(menthoxy carbonyl)solandelctone F(91-10-T).

Dimethyl L-menthylmalate

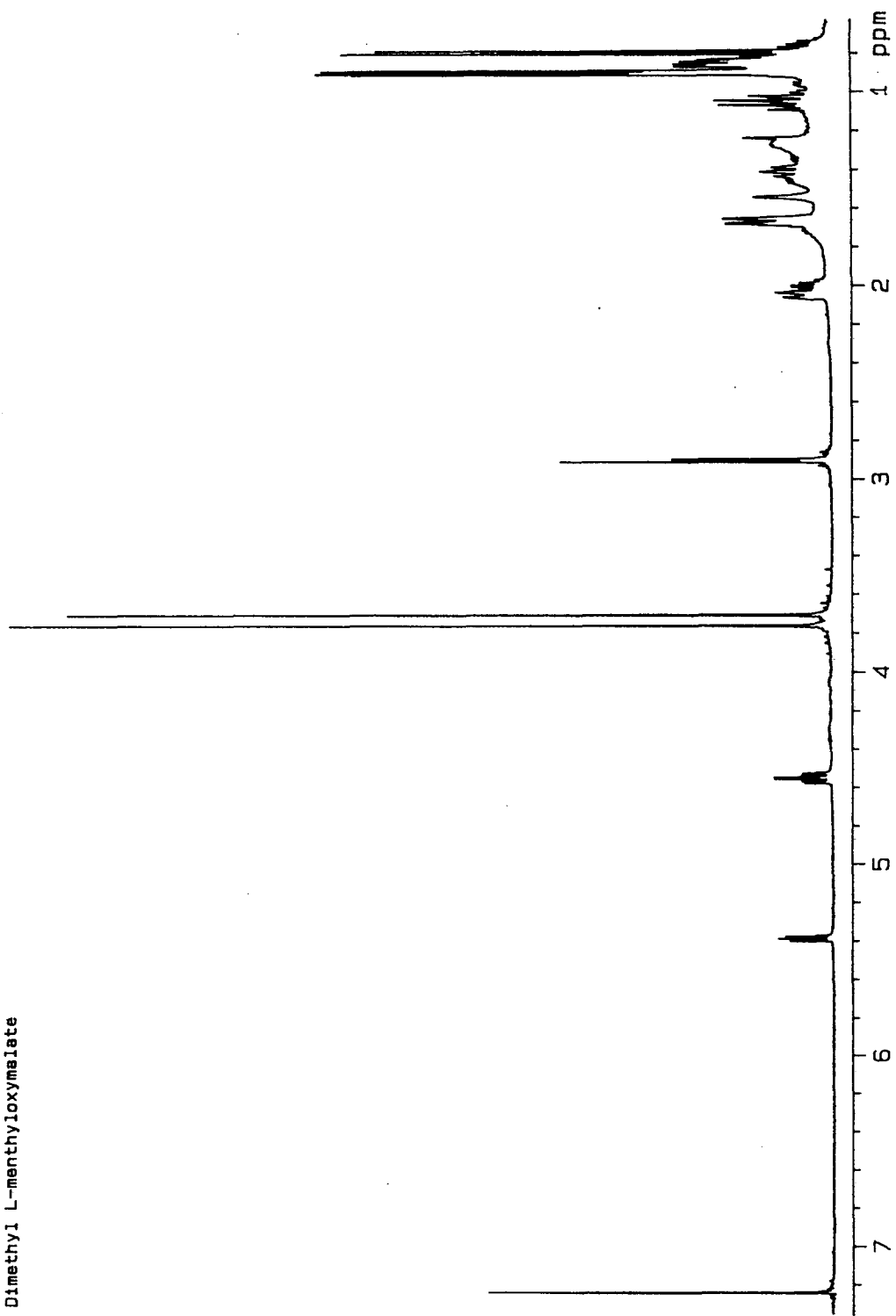


Fig. 3-71. Proton NMR spectrum of (2S)-Dimethyl menthoxycarbonylmalate(91-10-X).

Dimethyl D-menthoxyymalate

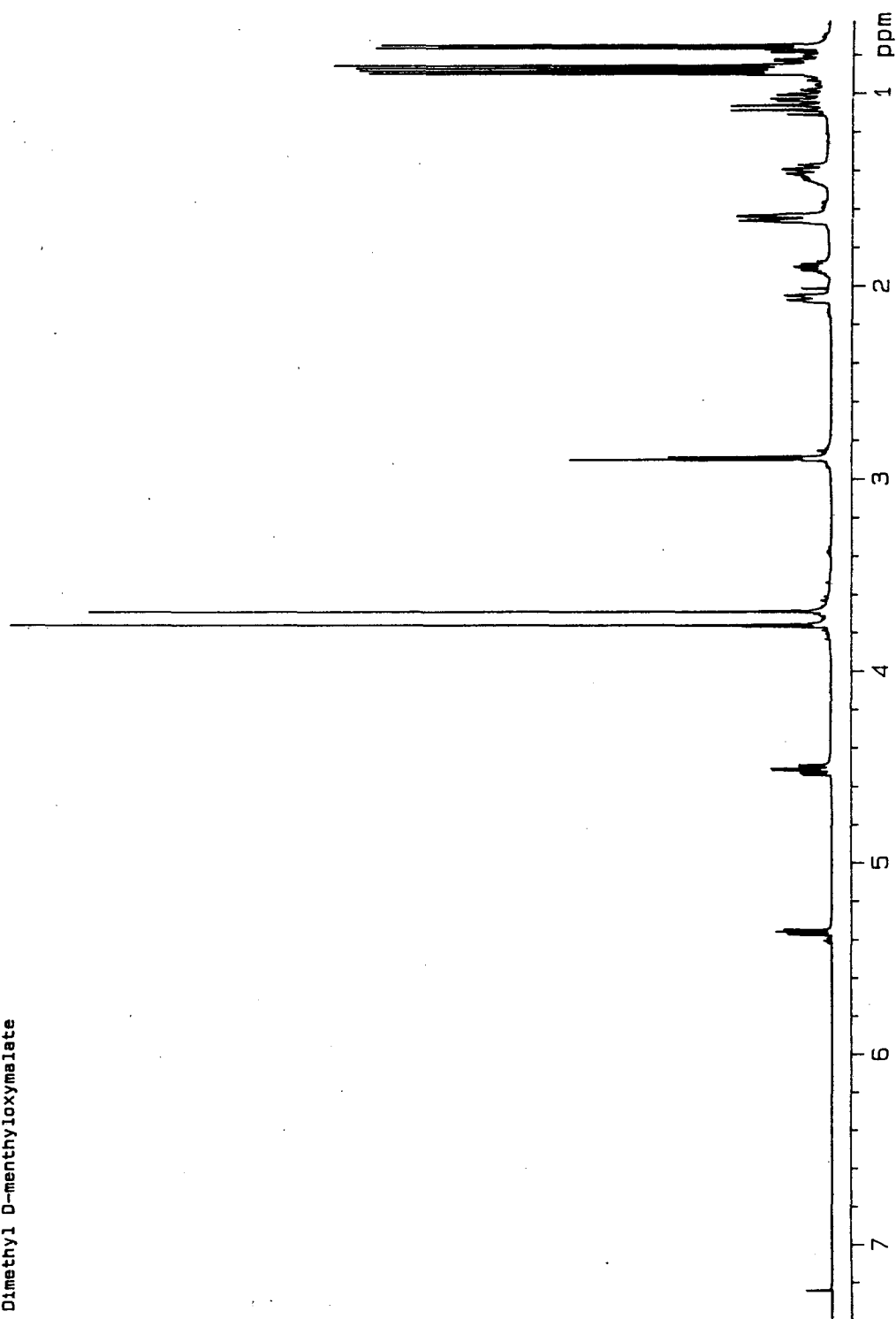


Fig. 3-72. Proton NMR spectrum of (2*R*)-Dimethyl menthoxy carbonylmalate(91-10-Y).

제 4 장 해면동물의 대사물질

4. 1. 서론

해면동물(phylum Porifera)은 후생동물(metazoans)중 가장 원시적인 다세포 동물로서 현존하는 해양동물중 가장 다양한 생물종의 하나로 전세계에 10,000종 이상이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들의 분포는 대단히 넓어 열대에서 한대까지 전세계의 거의 모든 해역뿐만 아니라 간조선부근부터 9000m까지의 깊이에도 서식하고 있다. 이들은 크게 석회해면강(Calcarea 혹은 Calcispongiae), 육방해면강(Hexactinellida), 보통해면강(Demospongiae)인 3개의 강(class)으로 나누어 지며 우리나라 근해에서는 석회해면강(Calcarea) 9종, 육방해면강(Hexactinellida) 2종, 보통해면강(Demospongiae) 114종으로 모두 125종이 밝혀져 있다.

이들은 그 종류 및 서식 환경의 다양함과 채집의 용이함으로 인하여 해양 천연물 연구의 초기부터 많은 주목을 끌어 왔다. 더욱이 초기에 추출된 해면의 대사물질중에는 생리활성의 출현빈도가 매우 높아 집중적인 연구의 대상이 되어 왔다. 특히 50년대 후반 Caribbean Sea의 해면으로부터 추출된 세포독성물질 ara-T (spongothimidine)와 ara-U (spongouridine)은 현재 항바이러스제 혹은 항암제로서 각광을 받고 연구가 집중되고 있으며 상업적으로도 이용되는 ara-A, ara-C, acyclovir, AZT 등 modified nucleosides계 생리활성물질의 개발을 유발하는 동기가 되었다(Rinehart, 1988). 이와같이 연구가 집중된 결과 현재까지 해면에서 추출된 천연물은 전체 해양 천연물의 거의 35%를 차지하고 있으며 이는 단일 생물문으로서는 최대이다(Ireland *et al.*, 1988; Faulkner, 1988). 이러한 경향은 날이 갈수록 더욱 심화되고 있어 최근의 연구결과를 분석해 보면 해면이 해양 천연물에서 차지하는 비중은 계속적으로 증가하고 있다(최근의 연구보고중 약 45%를 차지하고 있다.) 천연물 연구 뿐만 아니라 이들과 다른 생물간의 화학적 생태에 대한 연구 또한 최근에 매우 활발히 이루어지고 있다.

해면에서 추출된 천연물은 그 구조 또한 지극히 다양하여 terpenenoids, polyketides, amino acids, mixed biosynthetic products 등 모든 생합성의 전구 물질로부터 생성 가능한 천연물이 망라되어 있다. 수 백종 이상의 해면이 화학적으로 조사되어 왔고, 많은 경우 각 종에 따른 특이한 물질들이 추출되었으므로 여기에서 각각의 종의 천연물을 개별적으로 분석하는 것은 대단히 어렵다. 또한 해면에 대한 분류체계가 확실하지 않아 여러 이론이 존재하고, 동일 표본에 대해서도 학자에 따라 목, 과 및 속을 달리하는 예가 적지 않으므로 생물의 종류별로 천연물을 특징짓는 것도 어려움이 많다.

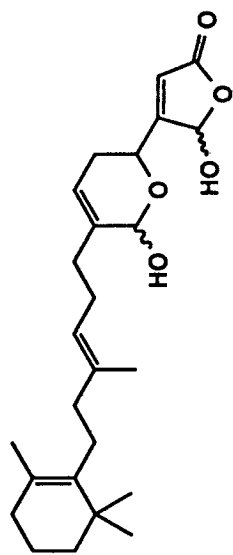
뿐만 아니라 해면은 많은 경우에 다량의 착생 생물(epiphytes)이나 micro-algae, bacteria 등을 체내에 다량으로 보유하고 있으므로(*Aplysina cavernicola*의 경우는 조직 부피의 38%가 bacteria) 추출된 물질이 해면의 고유한 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 미세조류의 대사물질인가의 구분이 어렵다(Bergquist & Wells, 1983; Faulkner, 1984). 대표적인 예로 가장 연구가

많이 된 해면의 일종인 *Dysidea*속의 경우를 보면 terpenoids, alkaloids, diphenyl ethers 등 구조적으로 연관이 전혀 없고 기원도 서로 상이한 물질들을 함께 보유하고 있는데 이들중 최소한 일부는 공생하는 광합성 생물에 의하여 합성된 것으로 추측되고 있다(Faulkner, 1984; 1986). 또한 잘 알려진 예로서 강력한 DSP toxin인 okadaic acid는 해면 *Halichondria okadai* 에서 처음 추출되었으나 실제로는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 대사 물질임이 규명되었다(Tachibana *et al*, 1981; Murata *et al*, 1982). 이러한 점에 착안하여 생리활성 물질을 함유하는 해면으로부터 이들 미생물을 분리, 배양하여 산업적 가치가 높은 신물질의 대량생산을 위한 시도가 최근에 진행되고 있다.

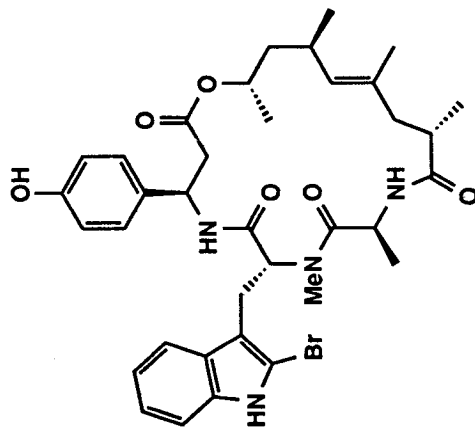
이러한 분류학상의 어려움과 천연물의 생산주체의 모호함을 감안하고 현재까지의 연구 결과를 개략적으로 살펴 보면, 먼저 천연물 화학 연구는 해면의 여러 강중 주로 Demospongiae강에 대하여 집중적으로 이루어져 왔다. 그러나 Demospongiae강에 속하는 해면들은 목, 과 혹은 속에 따라 함유하는 천연물의 종류가 매우 다름이 밝혀졌다. 먼저 해양 천연물중 매우 중요한 위치를 차지하는 terpenoids와 terpene part가 포함된 mixed biosynthetic products는 여러 종류의 해면에서 매우 다양한 탄소 골격의 형태로 추출되었으나 특히 Demospongiae에 속하는 Dictyoceratida와 Dendroceratida 의 두 목에서 집중적으로 추출되었다. 그러나 *Axinella*, *Acanthella* 및 *Hymeniacydon*속등 다른 목에 속하는 해면으로부터 isocyanide, isothiocyanates, formides 등 nitrogen part가 terpene에 결합된 특이한 형태의 물질들이 다수 발견되었다. Verongida목으로 부터는 다양한 형태의 alkaloids 즉 nitrogen을 포함한 물질들이 추출되었는데 이들의 구조적인 특이성이 Dictyoceratida목의 한 과(Verongiidae)로 전통적으로 분류되었던 이 종류의 해면이 근래 독립된 목으로 분류하게 된 주요 이유이다(Bergquist & Wells, 1983). Polyacetylenes은 여러 종류의 해면에 걸쳐서 추출되고 있다.

해면동물에서는 다른 생물에서 찾아 보기 어려운 특이한 종류의 천연물이 다수 발견되었는데 이들은 소수의 속으로부터 집중적으로 추출되어 화학적으로 그들 속의 상징으로 여겨지고 화학적 분류의 지표로 이용되는 경우가 많다. 예를 들면 *Plakortis*, *Prianos* 및 *Sigmosceptrella*속으로 부터는 cyclic peroxide나 그로부터 기원함이 명백한 물질들이 추출되었다. 또한 *Petrosia*, *Xestospongia* 및 *Reniera*등에서는 천연물중 그 예가 극히 드문 quinolizidine alkaloids 및 그와 구조상으로 유사한 물질들을 보유하고 있으며 *Algelas*와 *Adocia*속으로 부터 terpene과 adenine 혹은 guanidine이 결합된 매우 드문 형태의 mixed biosynthetic products가 많이 추출되었다. 이 밖에도 여러 종류의 해면으로부터 구조의 분석이 지극히 어려운 복잡하고 독특한 형태의 물질들이 많이 추출되었다.

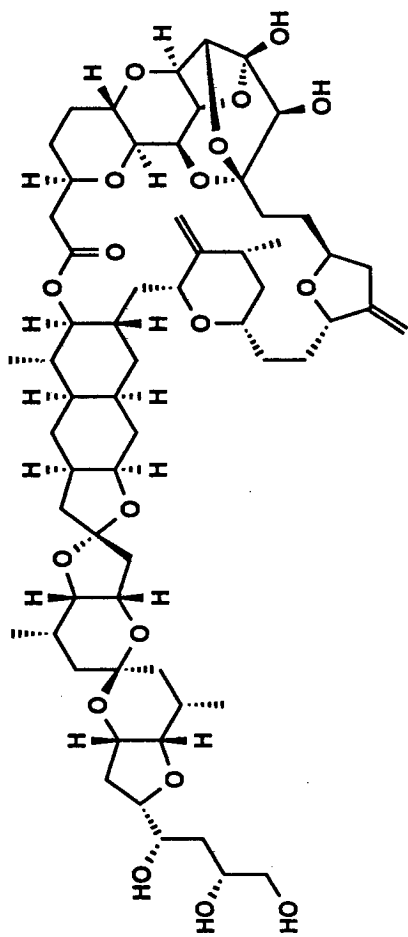
해면 대사물질의 구조적 다양함과 강력한 생리 활성도는 필연적으로 신물질의 산업화를 위한 시도를 유발시켜 현재까지 물질특허를 획득한 해양 천연물의 절반 이상이 해면에서 추출된 물질이다. 현재 해면의 천연물로서 특허를 획득하여 산업화의 가능성이 탐색되고 있거나 산업화 과정이 진행중인 물질중 대표적인 예를 살펴보면 *Halichondria okadai*와 *Lissodendryx*속으로부터 분리된 항암물질 halichondrin B, *Luffariella* 속으로부터 분리된 소염, 진통물질 manoalide,



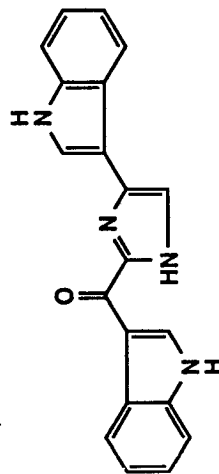
manoalide (*Luffariella* spp.)
- antiinflammatory, analgesic



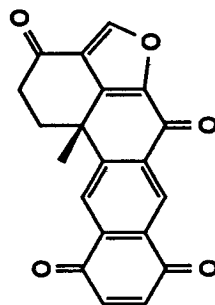
jaspamide (=jasplakinolide, *Jaspis* sp.)
- antifungal, cytotoxic



halichondrin B (*Halichondria okadae*)
-antitumor

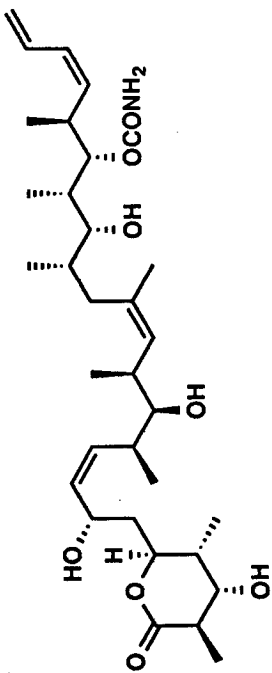


topentin-A (*Topsentia genitrix*)
-antiinflammatory, antitumor

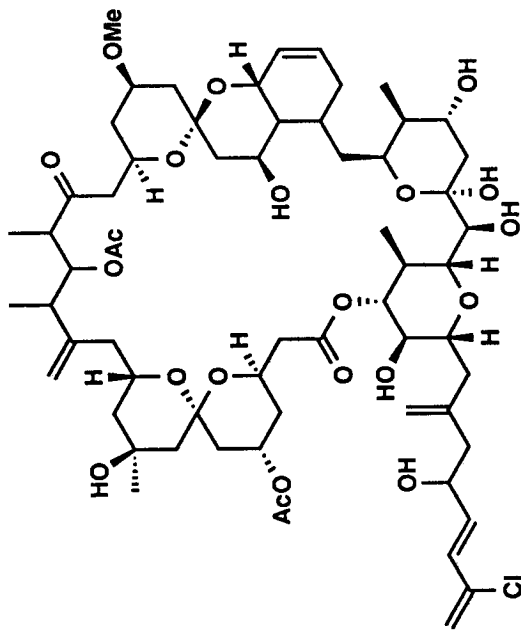
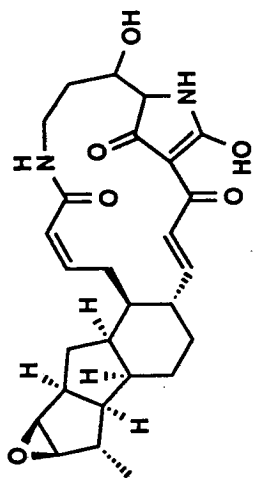


halenaquinone (*Xestospongia exigua*)
-antitumor

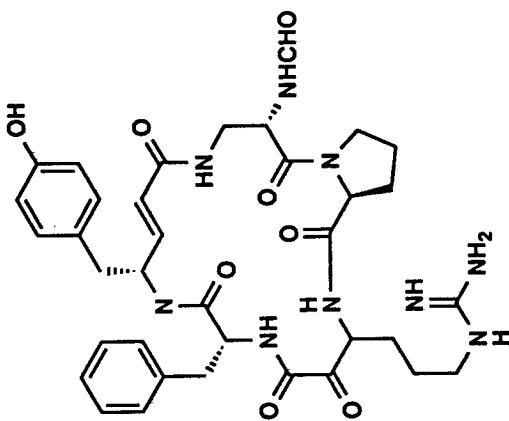
Fig. 4-1. Potential drugs isolated from sponges.



Discodermide (left) and discodermolide(right) (*Discodermia dissoluta*)
-cytotoxic, antifungal



spongistatin 1 (*Spongia* sp. and *Hyrtios altum*)
-cytotoxic



cyclotheonamide A (*Theonella* sp.)
-thrombin inhibitor

Fig. 4-1. Continued.

Topsentia 속의 항암, 소염물질 topsentins, *Xestospongia exigua*로부터 분리된 항암물질 halenaquinone, *Jaspis* 속으로부터 분리된 항진균, 세포독성물질 jaspamide, *Discodermia dissoluta*로부터 얻어진 항진균, 항암물질 discodermide와 discodermolide, *Theonella* 속의 항혈전 물질 cyclotheonamides, *Spongia* 속과 *Hyrtios altum*으로부터 추출된 항암물질 spongistatins 등이 있다 (de Silva and Scheuer, 1980; Hirata and Uemura, 1986; Bartik, et al, 1987; Zabriskie, et al, 1986; Crews, et al, 1986; Gunasekera, et al, 1991; Pettit, et al, 1993; Fusetani, et al, 1990; Faulkner, 1996, Fig. 4-1).

해면의 천연물은 2,000 이상이 알려져 있어서 해양생물중 최대이기는 하나 현존하는 종 중에서 불과 5%미만 만이 연구되었으므로 신물질을 발견할 가능성은 여전히 매우 높다. 더우기 현재 다각도로 시도되고 있는 해면 천연물의 대량 생산이 성공할 경우 생리활성물질의 산업적 이용과 더불어 해면의 천연물은 해양 천연물 내지는 육상을 포함한 전 천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 남해안의 거문도, 거제도 및 제주도 연안에서 각각 채집한 *Petrosia corticata*, *Caminatus awashimensis* 및 1종의 미확인 해면의 대사물질을 연구하였다. 이들로부터 long-chain linear polyacetylenes와 cyclitol 계열의 acylglycerides를 분리하여 구조를 결정하였으나 신물질인 polyacetylenes는 현재 다양한 생리활성을 측정중이므로 완전한 구조의 보고는 차기 년도로 미루고 여기서는 질량과 핵자기공명등 기본적인 분광자료만 수록하였다. 연구 결과에 덧붙여 polyacetylenes 계열의 천연물에 대한 외국의 연구결과를 수집, 체계적으로 분석하였다. 이것은 polyacetylenes가 주로 추출되는 *Petrosia* 속의 해면이 우리나라 근해에 널리 서식하고 있을뿐 아니라 다양한 생리활성을 갖고 있어 응용가능성에 관심이 모아지고 있기 때문이다.

4. 2. *Petrosia corticata*의 대사물질

본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 해면동물은 거문도 해역(서도, 대삼부도, 백도) 근해에서 채집된 해면 *Petrosia corticata*로서 시료번호 917-1이다. 이들은 채집된 시료의 양과 유기 조추출물에 대한 TLC분석, brine shrimp 치사율등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 우수하였다. 917-1의 군체의 색깔은 바깥쪽은 고동색이고 안쪽은 베이지색이며 형태는 판상으로서 딱딱하고 잘 부러졌다.처음에 *Strongylophora* sp.로 생각되었으나 그후 다시 정밀하게 관찰한 결과 *Petrosia corticata*로 분류하는 것이 타당하게 판단되었다(심, personal commun.). *Petrosia* 속의 해면은 우리나라 근해에 널리 분포하고 있어서 거문도 뿐만아니라 본 연구진에서 지난 수년간 남해안의 제주도, 거제도등지에서 행한 채집에서 항상 다량으로 발견되었다. 따라서 이 속의 해면이 우리나라 근해의 대표적인 해면중의 하나로 생각된다.

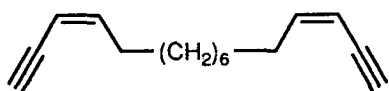
문헌조사에 따르면 *Petrosia* 속에서 분리된 천연물들중에 가장 특징적인 것은 polyacetylene 계 화합물이다(Faulkner, 1996). 이들은 chain이 길고 거의 대부분 unbranched 되어 있으며 일반적으로 분자량이 크다. 또한 구조적으로 변화가 클 뿐만아니라 항암, 항미생물, 효소저해등 다양

한 생리활성을 갖고 있는 경우가 많아 신물질의 개발 측면에서 큰 주목을 받고 있다. 본 연구에서 채집된 *Petrosia corticata*로부터도 여러 종의 polyacetylenes 및 그 유도체가 분리되었으며 그 중 4종의 신물질의 구조를 결정하였다. 따라서 polyacetylenes계 대사물질에 대한 자료의 수집과 체계적인 분석이 필요하여 외국의 기존 결과를 모두 수집하여 구조별로 분류하고 구조적인 특징과 생리활성을 요약하였다. 수집한 자료의 분석 결과는 다음과 같다.

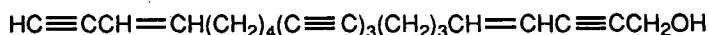
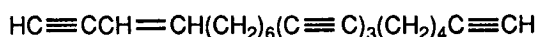
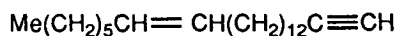
해면동물로부터 분리된 linear polyacetylene들은 생합성적으로 polyketide 계열에 속한다. *Petrosia*를 포함한 모든 해면동물로부터 얻어진 polyacetylene 유도체들을 구조적으로 간단한 부류부터 살펴보면 먼저 *Callyspongia flammea*로부터 대칭적인 bis-enyne인 callydiyne(1)이 분리되었으며 이 물질의 구조는 분광 데이터 분석에 의하여 확인되었다(Miao and Andersen, 1991). 홍해에서 채집된 *Siphonochalina* 속의 미분류 종으로부터 6개의 C₂₂ polyacetylene들이 분리되었다(Rotem and Kashman, 1979). 그러나 이들중에서 4개(2-5)만 완전한 구조가 결정되었으며 2개는 아직까지 완전하게 확인된 것은 아니다. Belize에서 채집한 *Cribrochalina vasculum*으로부터 5개의 새로운 acetylenic alcohol들(6-10)이 분리되었으며 이 물질들은 시험관내(*in vitro*)에서 면역억제와 항종양 활성을 보였다(Gunasekera and Faircloth, 1990). 최근 이 물질들에 존재하는 비대칭탄소의 절대배열을 확인한 결과 R과 S의 혼합물이란 것이 밝혀졌으며 이들중에서 (7), (9), (10)은 합성되었다(Hallock *et al*, 1995; Kulkarni *et al*, 1993). Bahamas해역의 동일한 해면에서 brine shrimp에 독성을 보이는 7개의 부대사물질들(11-14, 16-18)이 분리되었으며 이 물질들의 절대구조는 Mosher의 MTPA 방법에 의하여 S 배열로 결정되었다(Aiello *et al*, 1992; Guo *et al*, 1994). 역시 카리브해의 Egg섬 근해에서 채집한 동일한 해면에서 H-522 non-small cell lung line과 IGROV ovarian line에 항종양 활성을 보이는 8개의 acetylenic alcohol들(15-22)이 분리되었으며 이 물질들의 절대배열은 Mosher 방법에 의하여 R 배열로 결정되었다(Hallock *et al*, 1995). 그러나 정밀한 연구 결과 물질 (14), (16), (17) 및 (18)은 채집지역에 따라 절대배열이 각각 S와 R인 거울상이성체들(enantiomers)로 존재함이 밝혀졌다. 지금까지 비록 채집지역이 다르다 할 지라도 동일한 해면에서 서로 다른 enantiomer들이 분리되는 경우는 거의 없었으며 거의 대부분 동일한 입체구조를 가진 물질들이 얻어졌기 때문에 이것은 매우 특이한 결과라고 할 수 있다. 한편으로 이 결과를 해면분류의 오류로 인한 것에서 기인되었다고 생각할 수도 있다. 하지만 *C. vasculum*은 형태학적으로 너무나 분명하기 때문에 이러한 오류의 가능성은 매우 희박하다고 생각된다.

C₂₃ polyacetylene인 siphonodiol(23)이 *Siphonochalina truncata*로부터 분리되었다(Tada and Yasuda, 1984). 동일한 해면으로부터 siphonodiol(23), dihydrosiphonodiol(24), 그리고 tetrahydrosiphonodiol(25)이 분리되었으며 이 물질들은 모두 H⁺/K⁺-transporting ATPase를 억제하는 활성을 보여 주었으며 이들의 절대배열은 exciton chirality method에 의하여 결정되었다(Fusetani *et al*, 1987). 이와같이 홀수와 짝수개의 탄소수를 가진 polyacetylene들이 함께 존재하는 것은 polyketides의 생합성적인 관점에서 흥미를 불러 일으킨다.

Papua New Guinea에서 채집한 해면 *Petrosia ficiformis*와 이 해면을 포식하는 것으로 추측

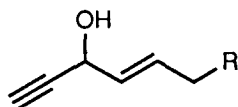


callydiyne (1)
(*Callyspongia flammea*)



(2 - 5)

(*Siphonochalina* sp.)



(6) R = C₁₄H₂₉

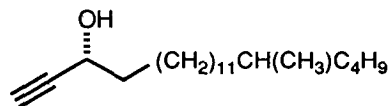
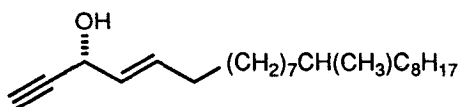
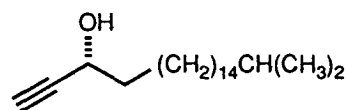
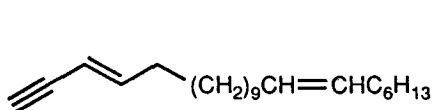
(7) R = -(CH₂)₈CH = CHC₆H₁₃

(8) R = -(CH₂)₉CH(CH₃)C₄H₉

(9) R = -(CH₂)₁₂CH(CH₃)₂

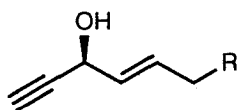
(10) R = -(CH₂)₈CH = CH(CH₂)₄CH(CH₃)₂

(*Cribrochalina vasculum*)



(11 - 14, from upper left clockwise)

(*Cribrochalina vasculum*)



(15) R = C₁₄H₂₉

(16) R = -(CH₂)₈CH = CHC₆H₁₃

(17) R = -(CH₂)₉CH(CH₃)C₄H₉

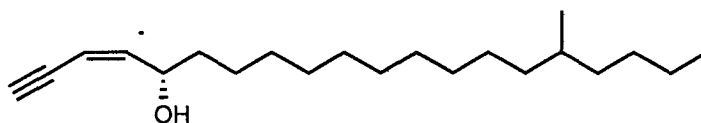
(18) R = -(CH₂)₁₂CH(CH₃)₂

(19) R = -(CH₂)₈CH = CH(CH₂)₄CH(CH₃)₂

(20) R = -(CH₂)₇CH(CH₃)C₈H₁₇

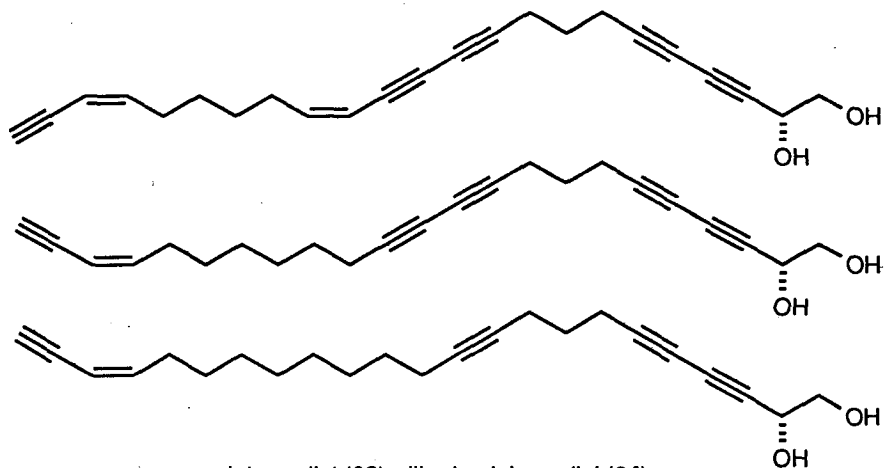
(21) R = C₁₅H₃₁

(*Cribrochalina vasculum*)

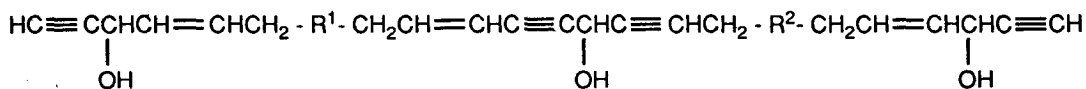


(22)

(*Cribrochalina vasculum*)

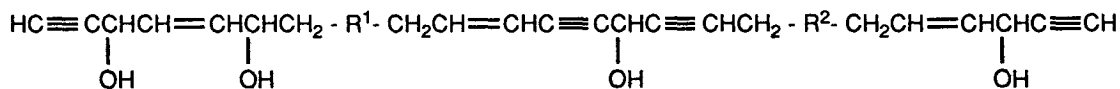


siphonodiol (23), dihydrosiphonodiol (24)
and tetrahydrosiphonodiol (25) (from top to bottom)
(*Siphonochalina trunoata*)



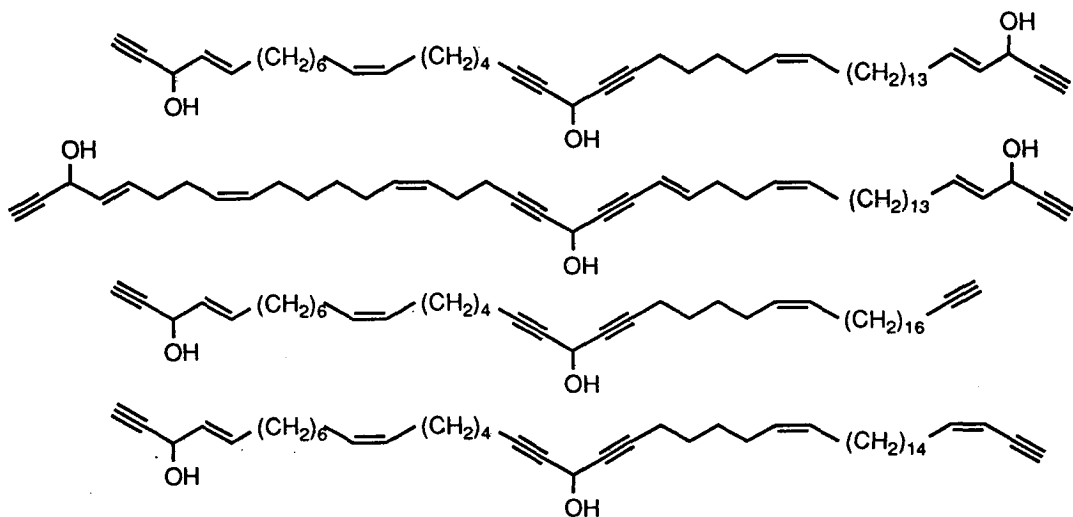
(26) $\text{R}^1 + \text{R}^2 = \text{C}_n\text{H}_{2n-6}$; $n = 25$ or 28

(27) $\text{R}^1 + \text{R}^2 = \text{C}_n\text{H}_{2n-4}$; $n = 28, 31,$ or 34



(28) $\text{R}^1 + \text{R}^2 = \text{C}_{24}\text{H}_{44}$

(*Petrosia ficiformis*)



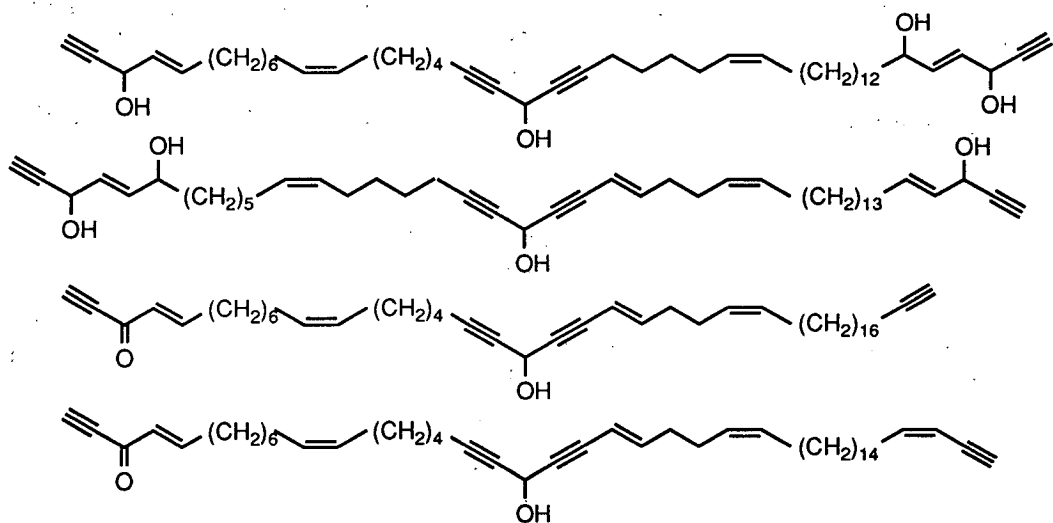
petroformynes 1 - 4 (29 - 32)
(*Petrosia ficiformis*)

되는 nudibranch *Peltodoris atromaculata*로부터 분자량이 매우 큰 두 개의 polyacetylene들 (26-27)이 분리되었다(Castiello *et al*, 1980). 이후 동일한 해면으로부터 1개의 polyacetylene(28)이 분리되었다(Cimino *et al*, 1985). 또한 4개의 새로운 polyacetylene들인 petroformynes 1-4 (29-32)가 *P. ficiformis*로부터 분리되었으며 이 물질들의 구조는 분광학적인 방법에 의하여 결정되었다(Cimino *et al*, 1989). Petroformyne 1(29)의 절대배열은 Mosher의 방법으로 결정되었으며 enynol(알코올에 인접한 acetylene을 가진 allyl alcohol)의 절대배열을 결정하는 방법중에 exciton chirality를 사용하는 방법의 유효성에 의문이 제기되었다(Bernart *et al*, 1994; Guo *et al*, 1994). 이 논쟁은 최근의 여러 연구결과들에 의하여 일단락되었는 바 그 결론은 enynol의 절대배열은 Mosher method나 유도체에 대한 x-ray crystallographic method에 의한 것만 신뢰할 수 있으며 CD exciton chirality method에 의해서는 알 수 없다는 것이다(Faulkner, 1996; Cardellina, personal commun). Petroformyne들은 brine shrimp *Artemia salina*와 섬게 수정란에 세포독성을 보였다. *P. ficiformis*로부터 다섯 개의 부대사물질들 즉 petroformynes 5(33 혹은 34), 6(35), 7(36)이 분리되었다. 그러나 이 물질들중에 어떤 것들은 구조가 완전히 결정되지 않았으므로 명확하지 않다(Cimino *et al*, 1990). 지중해에서 채집한 *P. ficiformis*로부터 12개의 polyacetylene들 (37-47)이 분리되었다(Guo *et al*, 1995).

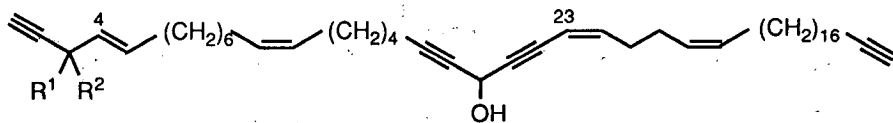
*Petrosia*속으로부터 C_{30} polyacetylene인 petrosynol(48)이 분리되었다. 이 물질은 sea urchin *Pseudocentrotus depressus*의 수정란의 세포분열을 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 억제하였다(Fusetani *et al*, 1983). 또한 일본에서 채집한 *Petrosia*속으로부터 petrosynol(48)과 함께 유도체인 petrosynone(49)이 분리되었다(Fusetani *et al*, 1987). Petrosynol(48)은 항미생물 및 starfish egg assay에서 활성을 보였으며 이후에 exciton chirality method에 의하여 이 물질의 절대구조가 제시되었다(Deshpande *et al*, 1989). 일본에서 채집한 또 다른 *Petrosia*속으로부터 4개의 새로운 polyacetylene들(50-53)이 얻어 졌다. 이 물질들은 brine shrimp 유충에 독성을 보였으며 ascidian의 수정란의 세포분열을 억제하였다(Ochi *et al*, 1994).

Bahamas에서 채집한 *Cribrochalina dura*의 시료로부터 대칭적인 acetylenic lipid인 duryne(54)이 분리되었으며 이 물질은 P388 murine leukaemia, colon, lung, 그리고 mammary human tumor cell line의 성장을 억제하였다(Wright *et al*, 1987). Duryne은 화합물의 대칭성을 이용하여 합성되었다(Deshpande *et al*, 1989). 카리브에서 채집한 *C. vasculum*으로부터 acetylenic alcohol인 vasculyne(55)이 분리되었으며 이 물질의 절대구조는 Mosher 방법으로 결정되었다(Dai *et al*, 1996). 이 물질은 미국의 국립 암 연구소(NCI; National Cancer Institute)에서 측정된 60-cell antitumor screening panel중에 melanoma와 colon tumor cell line에 대하여 상당한 세포독성을 보여 주었다.

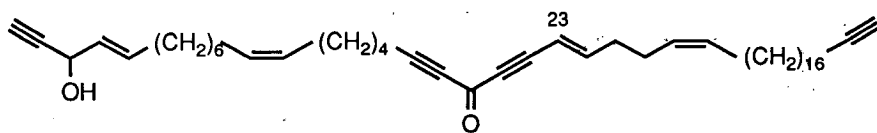
*Pellina triangulata*로부터 세포독성을 보이는 9개의 새로운 polyacetylene 유도체들인 triangulynes A-H(56-63)와 triangulynic acid(64)가 분리되었다. 이 물질들의 구조는 분광 데이터 분석과 화학적 변환에 의하여 결정되었다(Dai *et al*, 1996). Okinawa에서 채집한 *Adocia*속으로부터 대칭구조를 가진 adociacetylenes A-D(65-68)가 얻어 졌으며 이 물질들은 시험관내에서



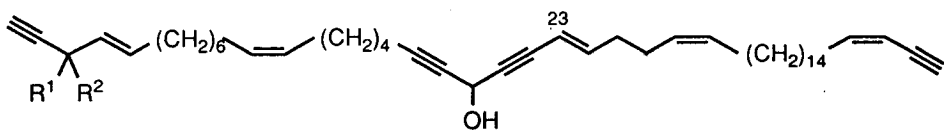
petroformynes 5 (33 or 34), 6 (35), and 7 (36)
(*Petrosia ficiformis*)



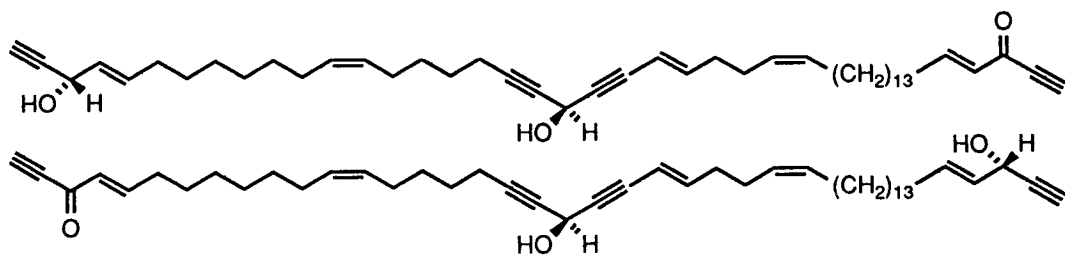
(37, $R^1 = H$, $R^2 = OH$), (38, 4,5-dihydro, $R^1 = H$, $R^2 = OH$)
(39, $R^1 R^2 = O$), and (40, 23,24-dihydro, $R^1 R^2 = O$)
(*Petrosia* sp.)



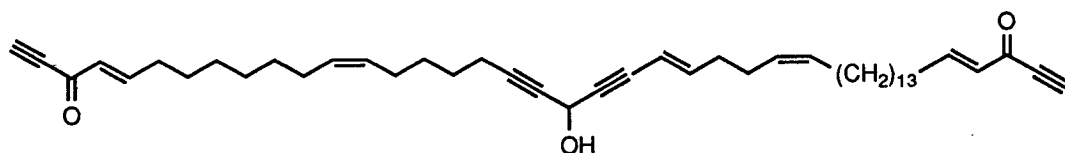
(41) and (42, 23,24-dihydro)
(*Petrosia* sp.)



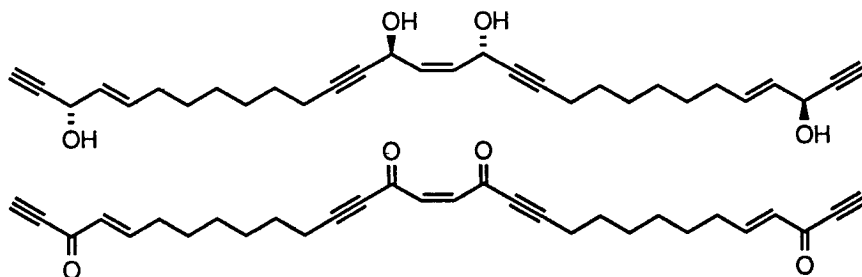
(43, $R^1 = H$, $R^2 = OH$), (44, $R^1 R^2 = O$), and (45, 23,24-dihydro, $R^1 R^2 = O$)
(*Petrosia* sp.)



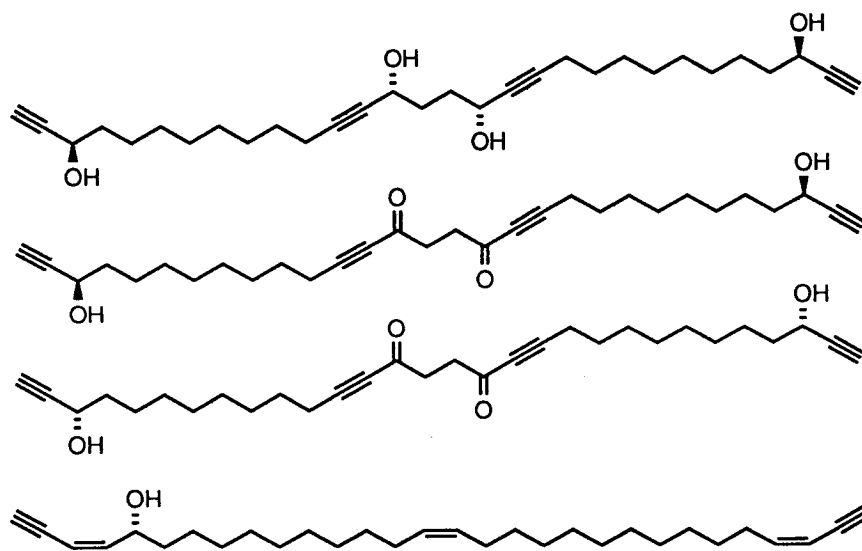
(46a, top) and (46b, bottom)
(*Petrosia* sp.)



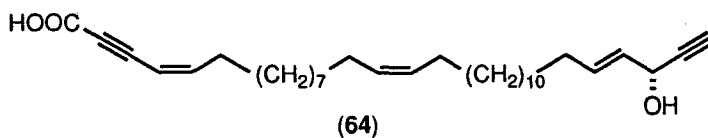
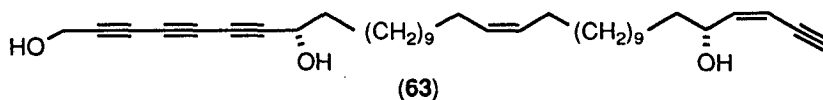
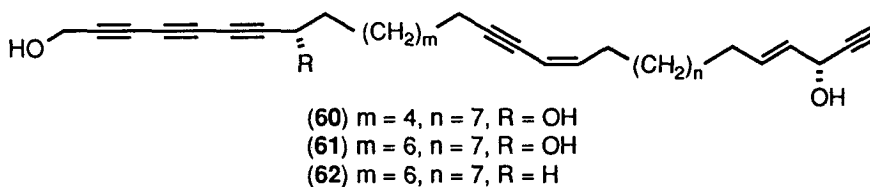
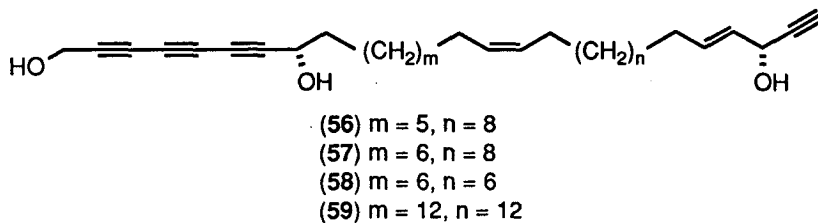
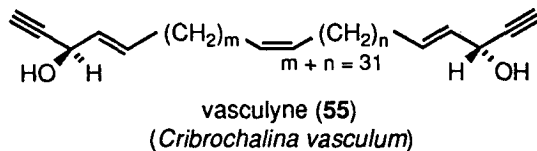
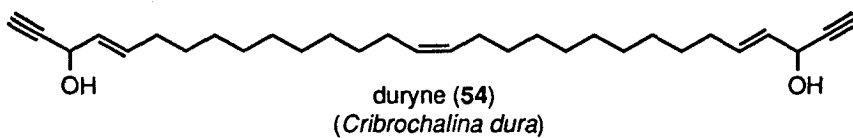
(47)
(*Petrosia* sp.)



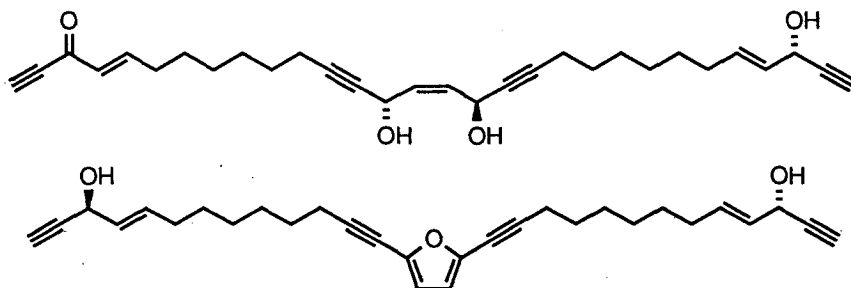
petrosynol (48) and petrosynone (49)
(*Petrosia* sp.)



(50 - 53)
(*Petrosia* sp.)



triangulynes A - H (56 - 63) and triangulynic acid (64)
(*Pellina triangulata*)



adociacetylenes A (65) and B (66)
(*Adocia* sp.)

adociacetylenes A, C, D는 endothelial cell-neutrophil leukocyte adhesion assay에서 억제 효과를 보였다(Kobayashi *et al*, 1996).

*Reniera fulva*로부터 5개의 diacetylene 유도체들(69-73)이 분리되었으며 이중에 2개는 vinyl bromide moiety(70-71)를 가지고 있었으며 이들을 제외한 다른 2차 대사물질들은 합성되었다(Cimino *et al*, 1977; Dorta de Marquez and Thaller, 1985). 또한 3개의 새로운 polyacetylenic alcohol들인 melynines A(74), B(75), 그리고 C(76)가 Vanuatu에서 채집한 *Xestospongia* sp.로부터 얻어 졌다. 이 물질들의 구조는 분광 데이터 분석에 의하여 결정되었으며 melyne A(74)는 장내에 존재하는 원형동물인 *Giardia*속에 활성을 보인다(Quinoa and Crews, 1988).

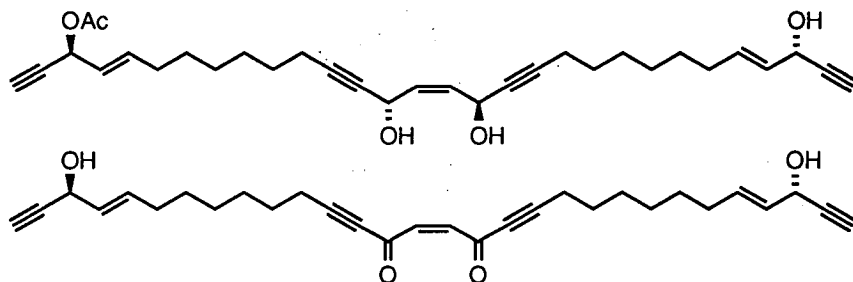
*Petrosia ficiformis*로부터 1개의 polyacetylenic acid(77)가 분리되었다(Cimino *et al*, 1985). 동일한 시료로부터 petroformynes A(78)와 B(79)가 분리되었다(Cimino *et al*, 1990). 일본 해역에서 채집한 *P. corticata*로부터 항진균 활성을 보이는 3개의 acetylenic acid들인 corticatic acids A-C(80-82)가 분리되었다(Li *et al*, 1994).

오스트레일리아의 Townsville 부근에서 채집한 해면 *Xestospongia testudinaria*로부터 브롬화된 bisacetylenic acid(83)가 얻어 졌다(Quinn and Tucker, 1985). *X. testudinaria*로부터 두 개의 새로운 브롬화된 acetylenic acid들(84-85)이 부대사물질로 분리되었다. 이 물질들의 구조는 알려진 acetylenic acid들과 분광 데이터를 비교함으로써 결정되었다(Quinn and Tucker, 1991). Mayotte에서 채집한 동일한 해면으로부터 항미생물 활성을 보이는 두 개의 brominated polyacetylenes인 xestospongic acid(86)와 대응하는 ethyl ester(87)가 얻어 졌다. Ethyl ester(87)는 Na^+/K^+ -ATPase를 억제하는 효과도 보여 주었다(Hu *et al*, 1992).

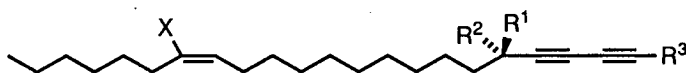
*Xestospongia muta*로부터 얻어진 C_{16} acetylenic acid(88)는 두 개의 conjugated vinyl bromide를 가지고 있었으며 생체내에서 anti-tumor activity와 CNS activity를 보여 주었다(Schmitz and Gopichand, 1978). Bahama에서 채집한 *X. muta*로부터 6개의 브롬화된 polyacetylenic acid들(89-94)이 분리되었다(Patil *et al*, 1992). 이 물질들은 6-12 μM 의 농도에서 HIV-1 protease에 활성을 보여 주었다. 여섯 개의 브롬화된 acetylenic acid들(95-100)이 홍해에서 채집한 *Xestospongia*속으로부터 methyl ester의 형태로 분리되었으며 이들의 구조는 분광 데이터 분석에 의하여 결정되었다(Hirsh *et al*, 1987).

일본에서 채집한 *Petrosia volcano*로부터 7개의 브롬화된 acetylenic acid들(101-107)과 3개의 methyl ester들(108-110)이 분리되었다(Fusetani *et al*, 1993). 350 m 정도의 심해에서 채집한 *Phakellia carduus*로부터 5개의 acetylenic acid들(111-115)이 대응하는 methyl ester들로 얻어 졌다(Barrow and Capon, 1994).

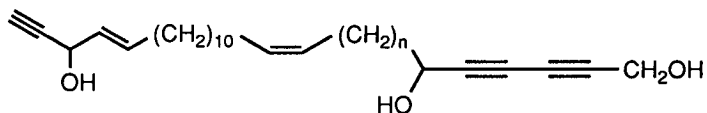
여러 가지 alkyl chain을 갖는 많은 (5*E*,9*Z*)-6-bromo-5,9-dienic acid들이 해면의 대사물질들로 보고되었다. 카리브해에서 채집한 *Agelas*속으로부터 4개의 천연물(116-119)이 분리되었으며 동일한 지역에서 채집한 *Petrosia*속으로부터 유도체(120)과 (121)가 얻어 졌다(Carballeira and Emiliano, 1993). Townsville에서 채집한 *Amphimedon terpenensis*에서도 유사한 물질인 (116)와 (117)가 분리되었다(Garson *et al*, 1993). 이와 같은 브롬화된 지방산들은 비록 polyacetylene기들



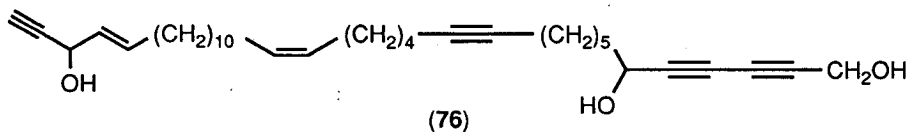
adociacetylenes C (67) and D (68)
(*Adocia* sp.)



- (69) X = H, R¹R² = O, R³ = H
 (70) X = Br, R¹R² = O, R³ = H
 (71) X = Br, R¹ = OH, R² = R³ = H
 (72) X = H, R¹ = R² = H, R³ = CH₂OH
 (73) X = H, R¹ = OH, R² = H, R³ = CH₂OH
 (*Reniera fulva*)

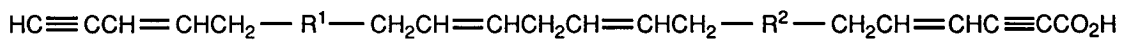


(74, n = 10) and (75, n = 9)

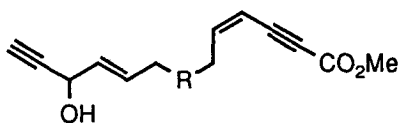


(76)

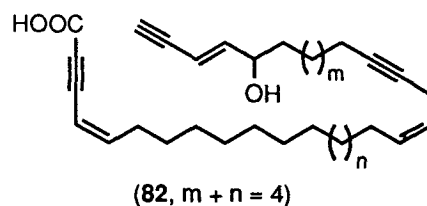
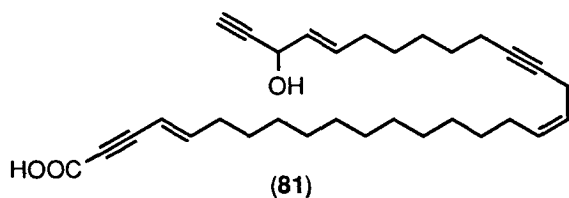
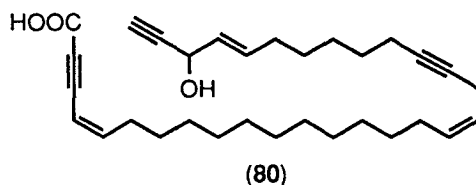
meylenes A - C (74 - 76)
(*Xestospongia* sp.)



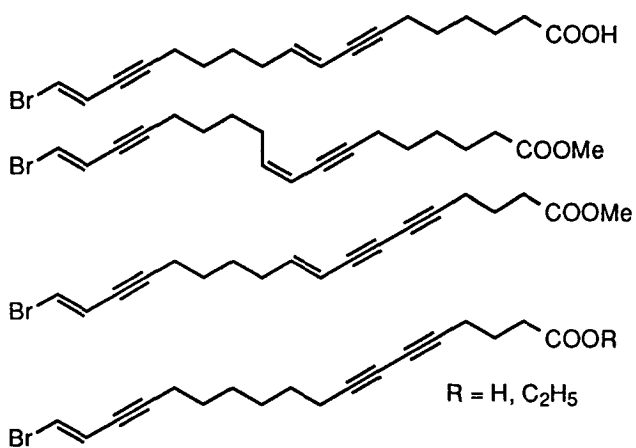
(77, R¹ + R² = C₂₅H₄₈)
(*Petrosia ficiformis*)



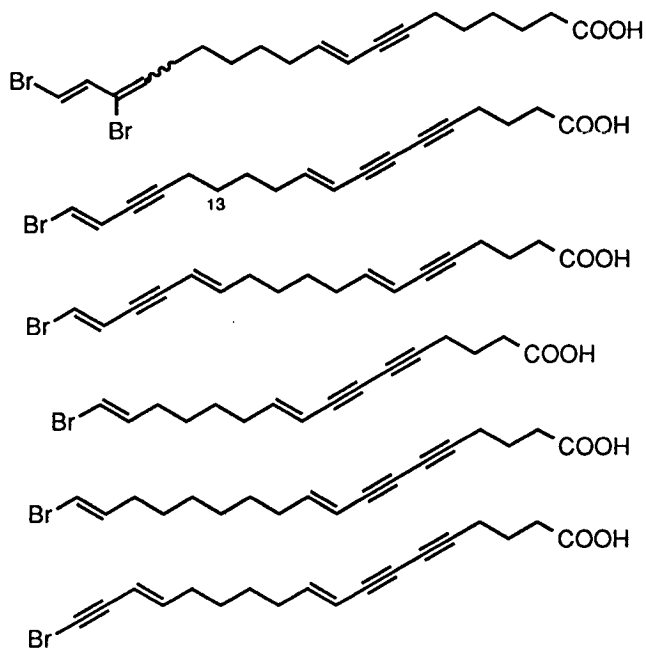
petroformyne A (78, R = C₃₁H₅₆) and petroformyne B (79, R = C₃₃H₆₀)
(*Petrosia ficiformis*)



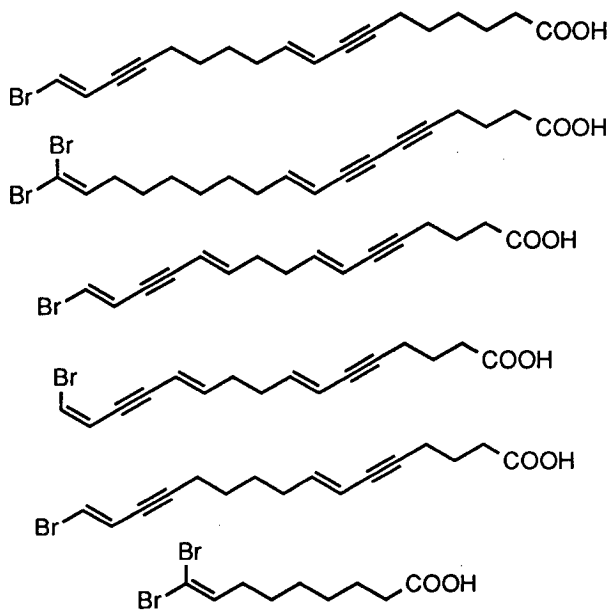
corticatic acids A - C (80 - 82)
(*Petrosia corticata*)



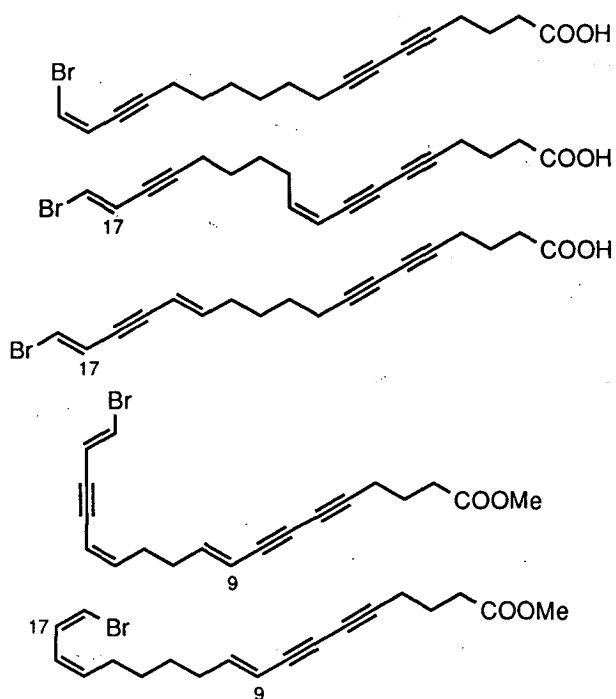
(83 - 87, from top to bottom, 86 ; xestospongic acid)
(*Xestospongia testudinaria*)



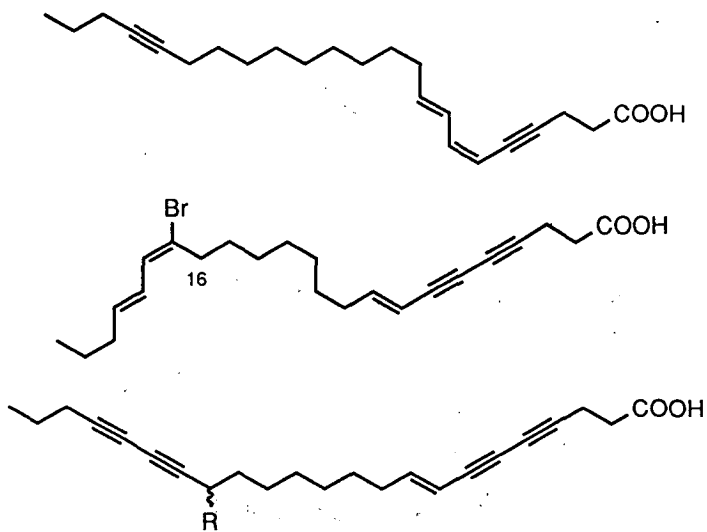
(88 - 94, from top to bottom, 90 ; 13,14-didehydro)
(Xestospongia muta)



(95 - 100, from top to bottom)
(Xestospongia sp.)



(101 - 110, from top to bottom, 103 and 105 ; 17Z, 107 ; 9,10-dihydro, 109 ; 17E, 110 ; 9,10-dihydro)
(*Petrosia volano*)



(111 - 115, 113 ; 16-OH, 114 ; R = OH, 115 ; R = OMe)
(*Phakellia oarduus*)

을 가지고 있지는 않지만 거의 동일한 생합성 과정을 거쳐 생성된다고 여겨지므로 본 연구에 첨가되었다. 인도네시아에서 채집한 *Oceanapia*속으로부터 2개의 새로운 브롬화된 acetylenic acid들(122-123)이 분리되었다(Ichiba *et al*, 1993). 또한 일본근해에서 채집한 *Clathria*속으로부터 불가사리 수정란의 세포분열을 억제하는 효과를 갖는 bromoacetylenic acids의 amide 유도체인 clathrynamides A-C(124-126)이 분리되었다(Ohta *et al*, 1993).

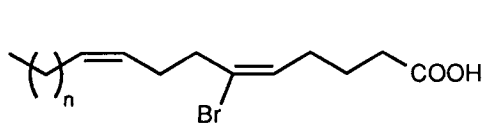
New Caledonia에서 채집한 *Cladocroce incurvata*로부터 특이한 cyclopropane ring을 가지고 있는 acetylenic acid인 cladocroic acid(127)가 분리되었다(D'Auria *et al*, 1993). Okinawa에서 채집한 *Petrosia*속으로부터 대단히 산화가 많이 이루어졌으며 HIV reverse transcriptase를 억제하는 효과가 있는 C₄₆ acetylenic acid인 petrosolic acid(128)가 분리되었다(Isaacs *et al*, 1993). 유사한 물질인 nepheliosyne A(129)가 Okinawa에서 채집한 *Xestospongia*속으로부터 분리되었다(Kobayashi *et al*, 1994).

(+)-Raspailyne A(130)가 *Raspailia pumila*로부터 분리되었다(Guella *et al*, 1986). 이 물질은 acetylenic aldehyde로부터 유래한 특이한 enol ether glyceride 유도체이다. *R. pumila*와 *R. ramosa*로부터 raspailyne A를 포함하여 유사한 유도체들(130-140)이 분리되었다(Guella *et al*, 1986). New Zealand에서 채집한 *Petrosia hebes*로부터 2개의 glyceryl enol ether들(141-142)이 분리되었다(Perry *et al*, 1990). 일본의 Okinawa에서 채집한 *Petrosia*속으로부터 glyceride 유도체들인 petrosynes I(141)과 II(142)가 분리되었다(Kondo *et al*, 1992). 이 물질들의 구조는 분광 데이터 해석과 diastereomer 혼합물들의 합성에 의하여 결정되었다(Iguchi *et al*, 1993). 이들과 *P. hebes*의 대사물질(141-142)과는 제시된 평면구조가 일치하는데 입체구조가 동일한가의 여부는 밝혀지지 않았다.

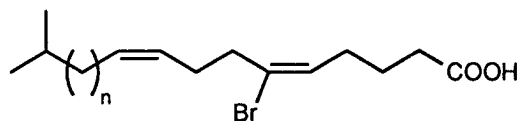
Petrosia spp. 에서 분리된 천연물 중에서 polyacetylene들의 다른 형태를 가진 대사물질들의 수는 극히 미미하다. 그러나 이들은 특이한 구조와 강한 생리활성이 보고되었으므로 여기서 간략히 언급한다. *Petrosia seriata*에서 oxoquinolizidine functionality를 지닌 petrosin(143)과 petrosin A(144)가 분리되었으며 이 물질들은 vasodilative activity와 어류독성이 있음이 보고되었다. 이와 동일한 물질들이 *Xestospongia* sp.에서도 분리되었다(Braekman *et al*, 1982; 1984; Kobayashi *et al*, 1989). 또한 카리브해에서 채집한 *Petrosia* sp.로부터 polycyclic heteroaromatic pigment인 petrosamine(145)이 분리되었다. 이 물질은 다른 해양고착생물의 대사물질들과 상당히 유사하기 때문에 이 해면에 공생하는 미생물에 의해서 만들어진 것이 아닌가 추측되어진다. 이 물질은 특이하게 THF용매에서는 녹색, 물에서는 보라색을 나타낸다(Molinski *et al*, 1988).

시료 917-1은 95년 11월에 거문도 근해 수심 20 - 25 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 냉동보관한 시료를 메탄올로 반복해서 추출한 후에 다시 dichloromethane으로 반복 추출하였으며 마지막으로 메탄올과 dichloromethane의 1:1 혼합용액으로 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물을 다시 dichloromethane과 물을 이용하여 분배하였으며 dichloromethane층은 다시 75% 메탄올 수용액층과 헥산으로 다시 분배하였다.

헥산층에 대해서 용매를 제거한 후에 silica 고속 감압 크로마토그래피를 실시하였다. 용리용

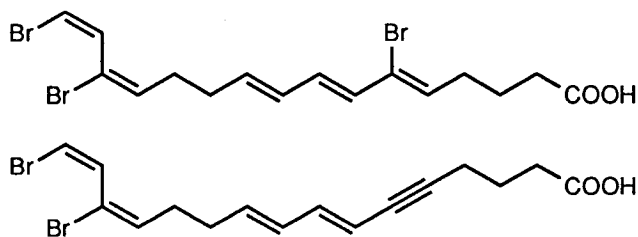


(116) n = 13
 (117) n = 14
 (120) n = 16
 (121) n = 17

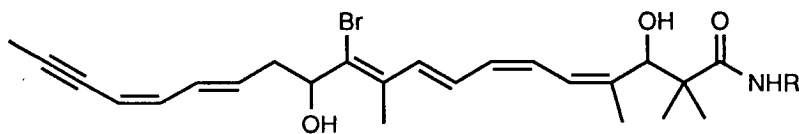


(118) n = 12
 (119) n = 13

(116 - 117 ; *Amphimedon terpenensis*, 116 - 119 ; *Agelas* sp., 120 - 121 ; *Petrosia* sp.)

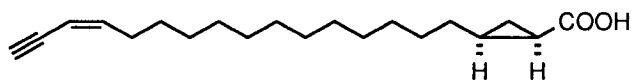


(122) and (123)
 (*Oceanapia* sp.)

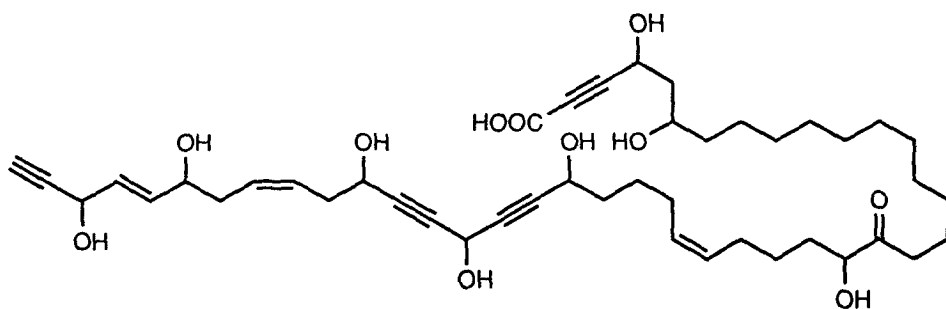


(124) R = H
 (125) R = -CH(CH₃)CH₂CH₂CH(OH)CH₃
 (126) R = -CH(CH₃)CH₂CH₂COCH₃

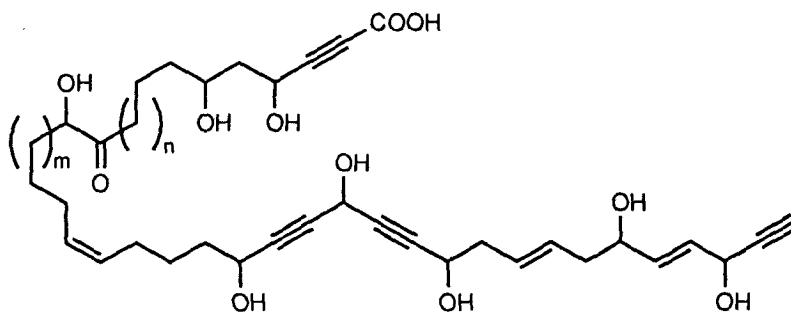
clathrynamides A - C (124 - 126)
 (*Clathria* sp.)



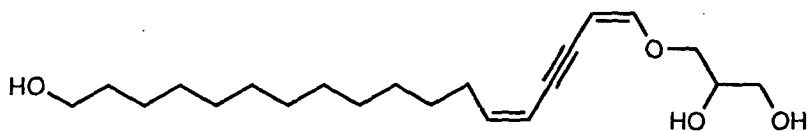
cladocroic acid (127)
 (*Cladocroce incurvata*)



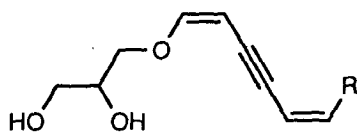
petrosolic acid (128)
(*Petrosia* sp.)



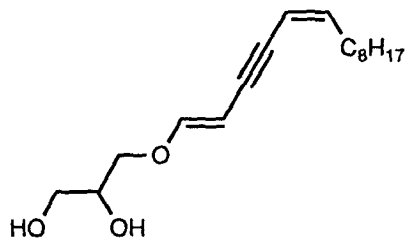
nepheliosyne A (129, $m + n = 13$)
(*Xestospongia* sp.)



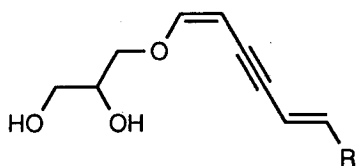
raspailyne A (130)
(*Raspailia pumila*)



- (130) R = $-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{OH}$
 - (131) R = $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$
 - (132) R = $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
 - (133) R = C_8H_{17}
 - (134) R = C_9H_{19}
 - (135) R = $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$
 - (136) R = $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
 - (137) R = $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
- (*Raspailia ramosa*)

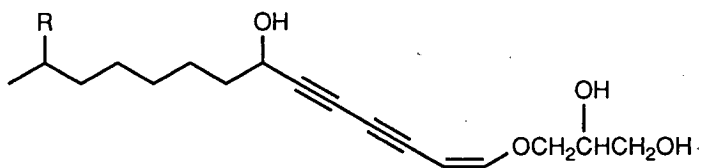


(138)
(*Raspailia ramosa*)

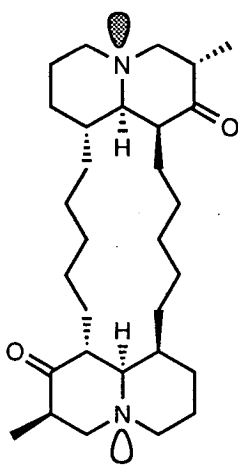
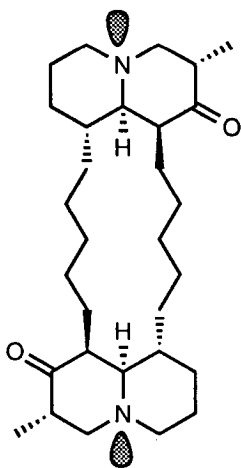


(139) R = C₈H₁₇

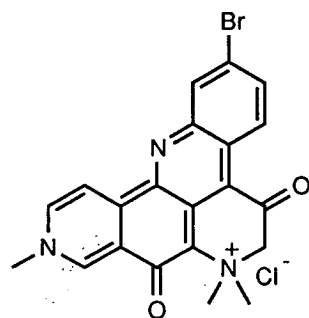
(140) R = -(CH₂)₆CH(CH₃)₂
(*Raspailia ramosa*)



(141, R = H; petrosyne I) and (142, R = Me; petrosyne II)
(*Petrosia hebes*)



petrosin (143, left) and petrosin A (144, right)
(*Petrosia seriata* and *Xestospongia* sp.)



petrosamine (145)
(*Petrosia* sp.)

매는 hexane과 EtOAc의 혼합용액으로 100% hexane에서부터 EtOAc의 양을 5%씩 증가시켜 사용하였다. ^1H NMR 스펙트럼 측정 결과 비극성 분획(20-35% EtOAc/hexane)과 약간 극성(40-45% EtOAc/hexane)을 나타내는 분획에서 흥미있는 peak들이 발견되었다. HPLC를 이용하여 모두 11개의 물질을 분리하였으며 일차적으로 이들 중 4개의 물질(917-1-I, -J, -Q, -R)의 구조가 분광자료의 해석과 화학적 반응에 의하여 결정되었다.

Polyacetylene 계열의 대사물질 917-1-I가 sticky material로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HRDCIMS와 HRFABMS)과 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터분석에 의하여 $\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 4-6). 먼저 ^{13}C NMR 스펙트럼과 DEPT 실험에서 6개의 quaternary carbons(δ 85.02, 84.96, 83.29, 78.14, 78.13)과 2개의 oxymethines(δ 62.78, 52.56)와 2개의 acetylenic methines(δ 81.12, 73.99) 및 4개의 이중결합(δ 146.27, 134.29, 130.20, 130.06, 129.64, 129.30, 128.54, 107.88)을 포함한 12개의 methine carbons, 그리고 24개의 methylene carbons이 나타났다. ^1H NMR에서도 2개의 acetylene protons(δ 3.04, d, $J = 1.0$ Hz; 2.54, 1H, d, $J = 2.5$ Hz)과 2개의 carbinol protons(δ 5.07, 1H, s; 4.81, d, $J = 5.9$ Hz)과 8개의 이중결합 methine protons(δ 5.97, 1H, dt, $J = 10.7, 7.3$ Hz; 5.88, 1H, dt, $J = 15.6, 7.0$ Hz; 5.59, 1H, dddt, $J = 15.6, 5.9, 1.5, 1.0$ Hz; 5.41, 1H, ddt, $J = 10.7, 2.4, 1.0$ Hz; 5.31-5.34, 4H, m)이 발견되었으며 δ 2.00-2.30에 7개의 methylene protons 그리고 δ 1.25 부근에 integration상으로 대단히 많은 methylene proton들이 존재함을 나타내었다. ^1H NMR에서 δ 2.00-2.30 즉 δ 2.30(2H, dt, $J = 7.5, 7.5$ Hz), 2.21(2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.20(2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.05(2H, dt, $J = 6.7, 6.7$ Hz), 그리고 2.02(2H, m), 2.01(2H, m), 2.00(4H, m)에 나타난 7개의 methylene protons는 이 화합물에 존재하는 이중결합에 인접한 수소 즉 allylic proton들로 해석되었다(Fig. 4-5). 이 대사물질의 주요 부분 구조는 ^1H - ^1H COSY와 HMQC에 의해서 결정되었으며 HMBC에 의하여 Fig. 4-2와 같이 확인되었다(Fig. 4-7). 이 물질에 존재하는 4개의 이중결합들중 Fig. 4-2에 나와 있는 바와 같이 chain의 terminal part에 존재하는 것은 NMR 해석에 의하여 위치가 확인되었지만 나머지 두 개의 이중결합 위치는 NMR에 의해서는 정확하게 확인되지 않았으며 mass spectrum 상에서 나타나는 fragmentation pattern과 ozonolysis에 의한 chemical degradation으로 결정되었다.

마지막으로 존재하는 이중결합의 geometry를 결정해야 한다. 이 물질의 terminal part에 존재하는 두 개의 이중결합의 경우에는 coupling constant의 측정에 의하여 각각 E ($J = 15.6$ Hz)와 Z ($J = 10.7$ Hz)로 확인되었다. 그러나 chain중간에 존재하는 2개의 이중결합의 proton들은 ^1H NMR 스펙트럼상에서 동일한 위치에 나타나기 때문에 coupling constant에 의하여 geometry를 결정하는 것이 불가능 하다. 그러나 일반적으로 isolated double bond에 인접하는 allylic methylene carbons의 chemical shift 값은 E geometry일 경우에 33 ppm, Z geometry일 경우에는 27 ppm정도로 알려져 있다(Breitmaier *et al*, 1990; Aiello *et al*, 1992). 따라서 917-1-I에 이 법칙을 적용하여 존재하는 2개의 isolated double bonds에 인접하는 allylic methylene(모든 allylic carbons의 위치는 HMQC와 ^1H COSY에 의하여 완전히 결정되었음)의 chemical shift 값을 측정 한 결과 각각 δ 26.68, 27.11, 27.15, 27.25로 나타나 모두 Z configuration인 것으로 결정되었다.

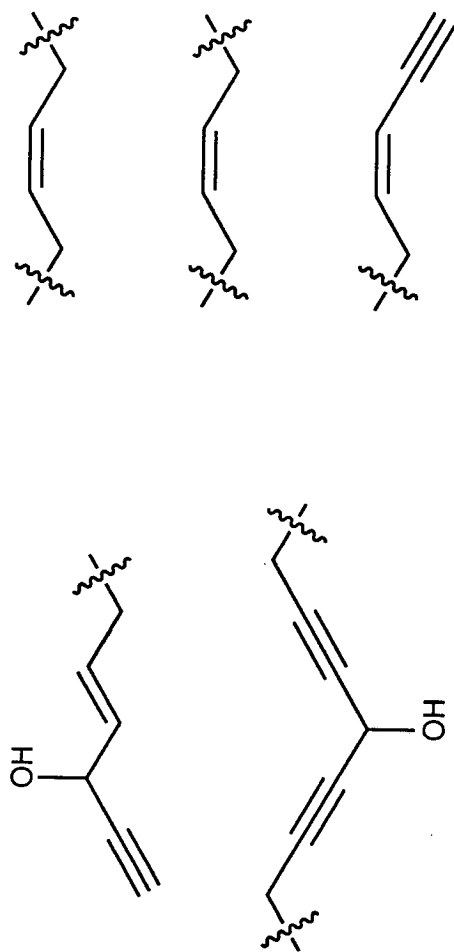


Fig. 4-2. Partial structures of compound 917-1-I.

유사한 polyacetylene 유도체 917-1-Q가 sticky material의 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HRDCIMS)과 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터분석에 의하여 $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 4-9). 이 물질의 분광자료는 917-1-I와 대단히 유사하였다. NMR 데이터상에 있어서 두 물질의 차이점은 먼저 ^{13}C NMR에서 917-1-I의 downfield methine carbons중 2개(δ 146.27, 107.88)이 사라진 대신에 upfield aliphatic region에 새로운 2개의 methylene carbons가 나타난 점이며 이에 상응하는 변화가 ^1H NMR에서도 발견되었다(Fig. 4-8). 즉 δ 5.97(1H, dd, $J = 10.7, 7.3$ Hz), 5.41(1H, ddt, $J = 10.7, 2.4, 1.0$ Hz) 그리고 δ 2.30(2H, dt, $J = 7.5, 7.5$ Hz)에 존재했던 peak가 사라지고 δ 2.15(2H, td, $J = 7.3, 2.9$ Hz)에 새로운 proton들이 나타났다. 그러므로 이 대사물질은 917-1-I의 한 쪽 terminal part에 존재하는 이중결합이 환원된 형태의 물질로 결정되었으며 이 사실은 ^1H - ^1H COSY와 HMQC 실험에 의해서도 입증되었다(Fig. 4-10).

다른 부대사물질 917-1-R이 무색의 oil로 분리되었다. 이 물질의 NMR data는 917-1-I와 거의 완전히 동일하였으며 ^1H - ^1H COSY와 HMQC 실험에 의해서도 이러한 사실이 확인되었다(Fig. 4-11 ~ 4-13). 따라서 이 물질은 917-1-I와 존재하는 부분구조는 완전 동일하며 차이점은 linear aliphatic chain의 길이에 있는 것으로 여겨지며 고분별능 질량 분석 데이터에 의하여 결정될 것이다.

마지막으로 물질 917-1-J가 무색의 oil로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(HRFABMS)과 ^{13}C NMR 데이터 분석에 의하여 $\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 4-15). 이 물질의 NMR 데이터도 대체적으로 917-1-I와 비슷하였으나 중대한 차이점들이 발견되었다. 먼저 917-1-I의 chain 중간부분에 존재하던 4개의 acetylenic quaternary carbons(δ 85.02, 84.96, 78.14, 78.13)와 1개의 oxymethine(δ 52.56)이 사라지고 대신에 1개의 이중결합에 해당하는 methine carbon(δ 112.66)과 quaternary carbon(δ 170.11), 그리고 carbonyl carbon(δ 180.45)이 나타났다. 상응하는 변화가 ^1H NMR 스펙트럼에서도 발견되어 δ 6.21(1H, d, $J = 2.0$ Hz)과 6.19(1H, d, $J = 2.0$ Hz)에 새로운 methine proton들이 나타났으며 또 917-1-I의 경우에 δ 2.20(2H, t, $J = 6.3$ Hz)과 δ 2.21(2H, t, $J = 6.3$ Hz)에 나타났던 peak들이 이 물질의 경우에는 δ 2.50(2H, t, $J = 7.6$ Hz)과 δ 2.51(2H, t, $J = 7.6$ Hz)으로 chemical shift가 변화되었다(Fig. 4-14).

이와 같이 ^{13}C NMR에서 새로이 나타난 δ 112.66과 170.11의 olefinic carbons와 δ 180.45에서 발견된 carbonyl carbon 그리고 ^1H NMR에서 δ 6.21이나 6.19의 chemical shift값들은 전형적인 $\alpha, \beta, \alpha', \beta'$ -unsaturated ketone functionality의 존재를 의미하였다. 그 뿐만 아니라 HMQC 실험에서 δ 6.21과 6.19의 methine proton들이 모두 하나의 carbon(δ 112.66)에 연결되어 있음이 확인되었으며 또 ^1H NMR상에서 발견된 integration 값(δ 6.21이나 6.19은 각각 1개의 proton에 해당됨)을 고려할 때 결국 1개의 이중결합으로 여겨졌던 olefinic carbon들(δ 112.66, d; 170.11, s)이 실제로는 대칭성을 가진 1개의 γ -pyrone ring으로 존재함을 알 수 있었다. 이 사실은 HMBC 실험에서 인접한 proton들과 carbon들 사이의 long-range correlation에 의해서도 확인되었다. 이 물질에 존재하는 long-chain을 제외한 다른 part의 부분구조는 ^1H - ^1H COSY 및 HMQC 실험에 의하여 917-1-I와 동일함이 발견되었다(Fig. 4-16). 그러므로 917-1-J는 917-1-I에 존재하는 $-\text{C}=\text{C}-$

C-CHOHC=C-의 functionality가 산화되면서 고리를 형성한 polyacetylene 유도체로 결정되었다. 문헌조사에 따르면 해면동물에서 분리된 여러 polyacetylenes 중에서 biacetylenic carbinol이 변화된 pyrone구조를 가진 예는 917-1-J가 유일하였다. 따라서 이 물질의 생리활성도의 절대적인 양과 917-1-I와의 상대적인 강도의 비교는 대단히 흥미로운 것으로서 현재 이 부분의 연구가 진행 중이다.

4. 3. *Caminatus awashimensis*의 대사물질

본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 해면동물 *Caminatus awashimensis*은 거제도 해금강 근해에서 채집된 해면으로서 시료번호 94G-19이다. 이들은 채집된 시료의 양과 유기 조추출물에 대한 TLC분석, brine shrimp 치사율(LC₅₀ 105 ppm)등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 우수하였다. 또한 문헌조사 결과 현재까지 *C. awashimensis*에 대한 천연물 화학적인 연구는 전혀 이루어지지 않았으므로 이 시료를 연구대상으로 선택하였다.

94G-19는 94년 12월에 거제도 해금강 근해 수심 15 - 20 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 군체의 색깔은 표면이 검은 회색이고 내부는 백색으로서 형태가 표고버섯과 비슷하였으며 아주 단단하였다. 냉동보관한 2 kg의 시료를 메탄올로 반복해서 추출한 후에 다시 dichloromethane으로 반복 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물을 다시 n-butanol과 물을 이용하여 분배하였으며 수용액층에서 얻어진 조추출물에 대하여 실리카 고속 가압 크로마토그래피를 실시하였다. 용매로는 ethyl acetate, acetone, methanol, acetic acid를 순서대로 용출하였으며 이렇게 얻어진 분획(fraction, fx)들에 대해 ¹H NMR과 brine shrimp독성을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 ethyl acetate와 acetone 분획에서 발견되었다. C₁₈ reversed-phase HPLC를 반복적으로 실시한 결과 7개의 물질(94G-19-A ~ -G)이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석에 의해서 cyclitol 유도체들로 결정되었다.

주대사물질인 94G-19-A가 무색의 기름형태로 얻어졌다. 이 물질의 핵자기 공명분광 스펙트럼을 측정한 결과 ¹³C NMR에서 모두 29개의 peaks가 발견되었으나 upfield peaks간의 intensity나 ppm 간격이 너무 좁아 정확한 carbon의 수를 알기 힘들었으며 대략적으로 38-40개 정도로 생각되었다(Fig. 4-18). 또한 ¹H NMR에서도 upfield protons간에 overlapping이 매우 심하였다. 후에 이 물질은 HRFABMS에 의하여 C₄₀H₇₈O₈으로 분자식이 결정되었다.

¹H NMR 상에서 upfield signals의 매우 심한 것으로 보아 이 물질은 long chain fatty acid에서 기원한 것으로 추측되었으며 두 개의 methyl signals이 역시 동일한 methylene peak(δ ~ 1.26 ppm)로 coupling을 하는 것으로 보아 91G-19-A는 2개의 fatty acid가 결합한 물질임을 알 수 있었다(Fig. 4-17). 또 ¹³C NMR 상의 69 - 82 ppm사이에 나타난 9개의 oxygenated carbon peaks(DEPT 실험에 의해서 3개의 methylene carbons와 6개의 methine carbons로 지정)와 ¹H NMR 상의 3.4 - 5.2 ppm 사이에 나타난 12개의 수소 peaks는 적어도 1개의 monosaccharide에서 유래된 ring이 존재하는 것으로 해석되었다.

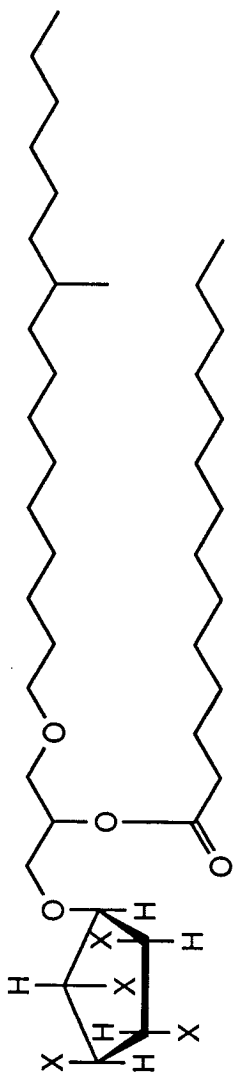
물질의 전체적인 구조는 proton decoupling과 ^1H COSY 실험에 의하여 결정되었다(Fig. 4-19). 먼저 δ 5.16의 proton은 두 쌍의 methylene protons(δ 3.77, 3.70; δ 3.57, 3.53)과 coupling을 하였다. 이 correlation들은 HMQC 실험에 의해서 확인된 대응하는 ^{13}C NMR signals (δ 71.04, 70.01, 68.89)와 함께 glycerol moiety의 존재를 확인시켜 주었다. δ 3.45와 3.41에 나타난 AB pattern의 proton들은 δ 1.53(2H)의 multiplet protons와 coupling을 하였으며 이 proton들은 다시 δ 1.26에 존재하는 큰 peaks와 correlation을 보였다. 이러한 사실은 O-alkylated된 long-chain이 존재한다는 것을 보여 주었다. 또한 δ 3.45와 3.41의 proton들과 δ 68.89의 carbon peak사이에 나타난 HMBC correlation에 의해서 O-alkylation이 일어난 위치가 glycerol moiety의 1번 position임을 알 수 있었다. 그리고 δ 2.33(2H)의 triplet가 δ 1.60(2H)의 multiplet와 coupling을 보였으며 이 proton들은 다시 δ 1.26의 큰 peak들과 correlation을 보여 주었다. 이 사실은 ^{13}C NMR에서 나타난 δ 173.88의 carbonyl peak와 함께 1개의 long-chain acyl group이 존재하는 것으로 해석되었다. 일반적으로 ester group이 붙어 있는 경우에 oxygenated proton의 chemical shift가 다른 경우(ether나 ketal등)에 비해서 상당히 downfield에 나타난다는 사실을 고려할 때 이 acyl group은 glycerol moiety의 2번 위치(^1H NMR, δ 5.16; ^{13}C NMR, δ 71.04)로 추측되었다.

마지막으로 나머지 5개의 oxygenated methine proton들은 같은 spin system에 속하며 cyclopentane ring을 형성하고 있다는 것이 ^1H COSY 실험에 의하여 분명히 드러났으며 결과적으로 cyclopentanepentol이 glycerol moiety와 ether-linkage를 형성하고 있다는 것으로 생각되었다. 이 사실을 분명히 하기 위하여 94G-19-A를 pyridine용매에 녹이고 acetic anhydride와 반응을 시킨 결과 94G-19-H가 주생성물로 얻어 졌다. ^1H NMR과 ^1H COSY 실험결과 이 물질은 94G-19-A의 C-2', -3', -4', -5'의 hydroxyl group이 acetylation되어 형성된 것이며 methylene peaks와 1개의 methine peak의 chemical shifts, coupling pattern, coupling constants등에는 거의 변화가 없었다. 따라서 이 실험결과는 glycerol의 1과 3번 위치가 각각 long-chain alkane과 cyclopentanepentol에 ether-linkage로 또 2번 위치는 long-chain acyl group에 연결되어 있다는 것을 의미하였다. 이와 같이 94G-19-A은 ether lipid에 long-chain fatty acid로부터 유래된 acyl group과 five-membered cyclitol이 결합된 glycolipid로 구조가 명확히 결정되었다(Fig. 4-3).

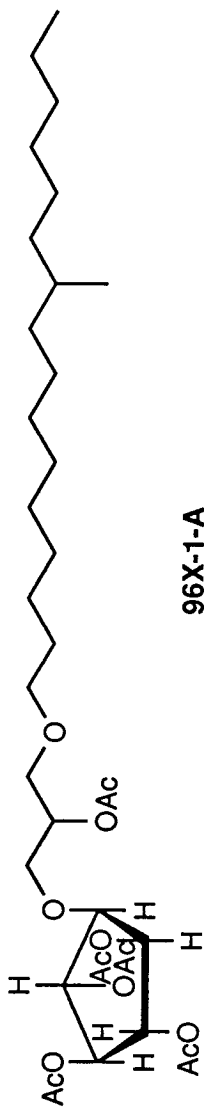
이 물질외에도 모두 6개의 유사한 유도체들이 분리되었으며 이 물질들의 구조는 단지 glycerol moiety에 붙어 있는 long-chain fatty acid에서 부분에서만 차이가 나기 때문에 이들의 정확한 구조는 추후에 실시될 질량분석의 fragmentation pattern과 chemical degradation에 의해서 결정될 것이다.

제주도 근해에서 채집한 어떤 미확인종의 해면으로부터 94G-19-A의 deacyl derivative (96X-1-A)가 분리되었다. 이 물질은 순수하게 분리하기가 매우 어려워 이 물질이 포함된 혼합물을 pyridine에 녹이고 acetic anhydride와 반응시킨 후에 reversed phased HPLC로 분리하였으며 ^1H 및 ^{13}C NMR 해석에 의하여 구조를 결정하였다(Fig. 4-3, 4-20 ~ 4-22).

문헌조사 결과 five-membered ring을 가진 이 계열의 cyclitol 유도체들은 지금까지 천연물

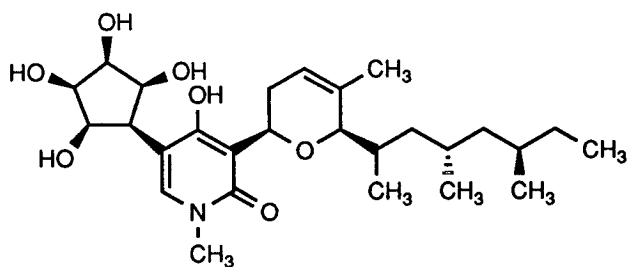


94G-22-A (X = OH) and **94G-22-H** (X = OAc)

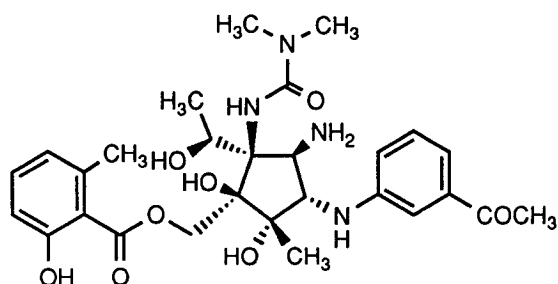


96X-1-A

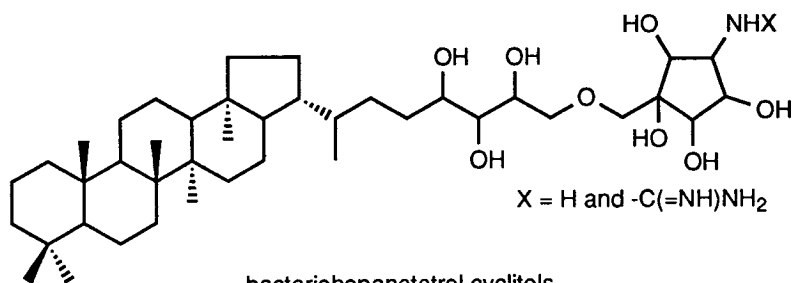
Fig. 4-3. Structures of glycolipids containing 5-membered cyclopentols.



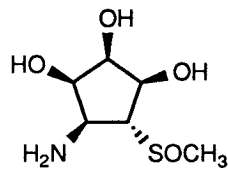
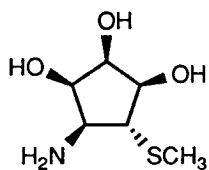
funiculosin
(fungus *Penicillium funiculosum*)



pactamycin
(*Streptomyces pactum* var. *pactum*)



bacteriohopanetetrol cyclitols
(bacterium *Methylobacterium organophilum*)



mannostatins A (left) and B (right)
(*Streptoverticillium verticillus* var. *quintum*)

Fig. 4-4. Natural products containing 5-membered cyclitols.

로는 해면동물에서만 발견되었으며 그 경우도 혼합물의 형태(crasserides와 keruffarides)로 분리되었고 순수하게 단일한 물질로 분리된 경우는 본 연구가 최초이다. 혼합물 형태로 분리되었기 때문에 구조 결정도 side chain의 길이와 branching pattern등은 mixture의 GC 분석에 의하여 결정하였고 cyclitol ring과 glycerol의 평면 및 입체구조는 chemical transformation으로 결정되어 보고되었다(Kobayashi *et al*, 1993; Costantino *et al*, 1993; 1994; Ishibashi *et al*, 1993).

Cyclitol들은 식물과 동물들에서 발견되는 polyhydroxycycloalkane 계열의 물질로서 생물들의 세포막을 구성하는 주요 구성성분인 phospholipids와 phytates의 전구물질들이다. 자연계에서 가장 흔하게 발견되는 cyclitol 유도체로서 *myo*-inositol이 있으며 이들은 모든 생물체내에서 이 자체로 존재하거나 다른 것과 결합된 형태로 존재하며 그 구조적 특징 때문에 pyranoside monosaccharide의 유도체로 간주된다. 문헌조사 결과 현재까지 발견된 5각형 고리를 가진 cyclitol 유도체들은 Fig. 4-4에서 보여진 것 처럼 funiculosin, pactamycin, bacteriophanetetrol ether 그리고 manostatins가 천연물로 보고 되었으며 자연계에서 발견되는 것과 입체화학적 구조는 다르나 간단한 cyclopentanepentol이 합성되었다(Ando *et al*, 1978; Wiley *et al*, 1970; Renous and Rohmer, 1985; Aoyagi *et al*, 1989; Sable *et al*, 1963; Angyal and Luttrell, 1970; Cocu and Postermak, 1971; Nishimura *et al*, 1996). 이들은 furanoside sugar에 대한 구조적인 유사성 때문에 nucleoside 유도체들을 만드는 중간체로 이용되었으며 합성된 nucleoside들은 항종양, 항미생물, 항바이러스 효과를 보여 주었다(Kam and Oppenheimer, 1981). 따라서 본 연구에서 분리된 cyclitol들도 상당한 생리활성이 있을 것으로 추측되며 현재 이를 위하여 천연물의 대량 분리가 진행 중이다.

4. 4. 실험 방법

4. 4. 1. *Petrosia corticata*로부터 천연물의 추출 및 분리

4. 4. 1. 1. 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 flash chromatography

해면 *Petrosia corticata*(시료번호 917-1)은 95년 11월에 거문도 근해에 위치한 서도, 대삼부도, 백도등지의 수심 20-25 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었으며 채집 즉시 드라이아이스로 냉동되어 그 상태에서 항공운송된 후 냉동고(-25°C)에서 보관되었다. 냉동보관한 2 kg의 시료를 해빙하여 짧게 자른 후에 메탄올(4 L X 2)로 추출하였으며 다시 dichloromethane(4 L X 2)으로 추출하였다. 마지막으로 Waring blender로 간 후에 메탄올과 dichloromethane의 1:1 혼합용액(3 L X 1)으로 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물의 양은 353.38 g 이었으며 다시 dichloromethane과 물의 분획(1:1 혼합액, 2 L)을 이용하여 염과 수용성 물질을 제거하였다. Dichloromethane층에서 얻어진 100.61 g은 다시 75% 메탄올 수용액층과 헥산(1:1 혼합액, 2 L)으로 다시 분배하였다.

헥산층에서 얻어진 조추출물의 양은 모두 72.20 g이었으며 이들 중 10.80 g을 취하여 silica 고속 감압 크로마토그래피를 실시하였다. 용리용매는 hexane과 EtOAc의 혼합용액으로 100% hexane에서부터 EtOAc의 양을 5%씩 증가시켜 사용하였다. ^1H NMR 스펙트럼 측정 결과 비극성 분획(20-35% EtOAc/hexane, 2.218 g)과 약간 극성(40-45% EtOAc/hexane, 0.190 g)을 나타내는 분획에서 흥미있는 peak들이 발견되었다.

4. 4. 1. 2. Polyacetylene 유도체들의 분리

헥산층을 silica 고속 감압 크로마토그래피로 분리하여 얻어진 20-35% EtOAc/hexane(2.218 g) 분획을 20% EtOAc/hexane에 녹이고 Cepak으로 여과한 후에 silica HPLC(YMC silica column, 2 x 25 cm, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리를 시도하여 retention time 16분에 나오는 peak를 모으고 다시 reversed-phase HPLC(YMC C_{18} column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 ml/min, MeOH)로 분리하였다. Retention time 23분, 27분, 30분에 917-1-I, -Q, -R이 각각 60, 21.5, 8.3 mg이 얻어 졌다.

917-1-I: $[\alpha]_D^{25} + 9.0^\circ(0.4)$; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.97(1H, dt, $J = 10.7$ and 7.3 Hz), 5.88(1H, dt, $J = 15.6$ and 7.0 Hz), 5.59(1H, ddt, $J = 15.6, 5.9, 1.5$, and 1.0 Hz), 5.41(1H, ddt, $J = 10.7, 2.4$, and 1.0 Hz), 5.34(1H, m), 5.33(1H, m), 5.32(1H, m), 5.31(1H, m), 5.07(1H, s), 4.81(1H, d, $J = 5.9$ Hz), 3.04(1H, d, $J = 1.0$ Hz), 2.54(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 2.30(2H, dt, $J = 7.5$ and 7.5 Hz), 2.20(4H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.05(2H, dt, $J = 6.7$ and 6.7 Hz), 2.02(2H, m), 2.01(2H, m), 2.00(4H, m), 1.50(4H, m), 1.41(2H, m), 1.37(4H, m), 1.35(2H, m), 1.34(4H, m), 1.32(2H, m), 1.28(2H, m), 1.27(4H, m), 1.26(4H, m), 1.25(12H, m); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 146.27(CH), 134.29(CH), 130.20(CH), 130.06(CH), 129.64(CH), 129.30(CH), 128.54(CH), 107.88(CH), 85.02(C), 84.96(C), 83.29(C), 80.58(C), 81.12(CH), 78.14(C), 78.13(C), 73.99(CH), 62.78(CH), 52.56(CH), 31.77(CH_2), 30.28(CH_2), 29.79(CH_2), 29.70($\text{CH}_2 \times 2$), 29.68($\text{CH}_2 \times 2$), 29.67($\text{CH}_2 \times 2$), 29.59(CH_2), 29.45(CH_2), 29.40(CH_2), 29.35($\text{CH}_2 \times 2$), 29.19(CH_2), 28.90(CH_2), 28.74(CH_2), 28.58(CH_2), 28.56(CH_2), 28.51(CH_2), 28.22(CH_2), 27.95(CH_2), 27.25(CH_2), 27.15(CH_2), 27.11(CH_2), 26.68(CH_2), 18.67(CH_2), 18.65(CH_2).

917-1-Q: ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.88(1H, dt, $J = 15.6$ and 6.9 Hz), 5.59(1H, ddt, $J = 15.6, 7.4$, and 2.0 Hz), 5.34(1H, m), 5.33(1H, m), 5.32(1H, m), 5.31(1H, m), 5.07(1H, t, $J = 2.0$ Hz), 4.82(1H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.54(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 2.21(2H, td, $J = 5.8$ and 2.0 Hz), 2.20(2H, td, $J = 5.8$ and 2.0 Hz), 2.15(2H, td, $J = 7.3$ and 2.9 Hz), 2.15(1H, s), 2.05(2H, q, $J = 6.8$ Hz), 2.02(2H, m), 2.01(2H, m), 2.00(4H, m), 1.51(2H, m), 1.50(2H, m), 1.42(2H, m), 1.38(2H, m), 1.36(4H, m), 1.33(4H, m), 1.31(2H, m), 1.28(2H, m), 1.27(2H, m), 1.26(4H, m), 1.25(2H, m), 1.24(14H, m); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 134.27(CH), 130.20(CH), 130.05(CH), 129.63(CH), 129.29(CH), 128.53(CH), 84.98(C), 84.92(C), 84.81(C), 83.28(C), 78.12(C), 78.11(C), 73.97(CH),

68.01(CH), 62.74(CH), 52.50(CH), 31.74(CH₂), 29.75(CH₂), 29.67(CH₂ x 4), 29.64(CH₂ x 2), 29.59(CH₂), 29.56(CH₂), 29.49(CH₂), 29.31(CH₂), 29.09(CH₂), 28.86(CH₂), 28.75(CH₂), 28.55(CH₂), 28.52(CH₂), 28.48(CH₂ x 2), 28.51(CH₂), 28.22(CH₂), 28.18(CH₂), 27.91(CH₂), 27.22(CH₂), 27.12(CH₂), 27.08(CH₂), 26.64(CH₂), 18.63(CH₂), 18.62(CH₂), 18.38(CH₂).

917-1-R: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.98(1H, dt, *J* = 10.6 and 7.4 Hz), 5.89(1H, dt, *J* = 15.6 and 6.1 Hz), 5.60(1H, ddt, *J* = 15.6, 6.3, and 1.5 Hz), 5.42(1H, ddt, *J* = 10.6, 2.4, and 1.5 Hz), 5.34(1H, m), 5.33(1H, m), 5.32(1H, m), 5.31(1H, m), 5.07(1H, s), 4.82(1H, d, *J* = 4.9 Hz), 3.05(1H, d, *J* = 1.0 Hz), 2.55(1H, d, *J* = 2.0 Hz), 2.30(2H, tdd, *J* = 7.3, 7.3, and 1.5 Hz), 2.22(2H, td, *J* = 7.3 and 2.0 Hz), 2.21(2H, td, *J* = 7.3 and 2.0 Hz), 2.06(2H, q, *J* = 6.8 Hz), 2.02(2H, m), 2.01(2H, m), 2.00(4H, m), 1.50(4H, m), 1.41(2H, m), 1.37(4H, m), 1.35(2H, m), 1.34(4H, m), 1.32(2H, m), 1.28(2H, m), 1.27(4H, m), 1.27(6H, m), 1.26(2H, m), 1.24(16H); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 146.31(CH), 134.29(CH), 130.21(CH), 130.07(CH), 129.65(CH), 129.31(CH), 128.54(CH), 107.88(CH), 85.03(C), 84.97(C), 83.28(C), 80.58(C), 81.12(CH), 78.11(C x 2), 74.00(CH), 62.78(CH), 52.55(CH), 31.77(CH₂), 30.27(CH₂), 29.77(CH₂), 29.69(CH₂ x 4), 29.66(CH₂ x 3), 29.58(CH₂), 29.58(CH₂), 29.44(CH₂), 29.38(CH₂), 29.33(CH₂ x 2), 29.18(CH₂), 28.88(CH₂), 28.73(CH₂), 28.58(CH₂), 28.56(CH₂), 28.49(CH₂), 28.20(CH₂), 27.93(CH₂), 27.24(CH₂), 27.13(CH₂), 27.09(CH₂), 26.66(CH₂), 18.65(CH₂), 18.63(CH₂).

계속해서 핵산층을 silica 고속 감압 크로마토그래피로 분리하여 얻어진 40-45% EtOAc/hexane(0.190 g) 분획을 reversed-phase HPLC(YMC C₁₈ column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 ml/min, MeOH) 분리하였다. Retention time 27분에서 917-1-J가 13.5 mg 얻어 졌다.

917-1-J: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.21(1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.19(1H, d, *J* = 2.0 Hz), 5.97(1H, dt, *J* = 10.8 and 7.3 Hz), 5.86(1H, dt, *J* = 15.1 and 7.1 Hz), 5.59(1H, ddt, *J* = 15.1, 6.4, and 1.5 Hz), 5.41(1H, ddt, *J* = 10.8, 1.5, and 1.5 Hz), 5.37(1H, m), 5.34(1H, m), 5.32(1H, m), 5.31(1H, m), 4.82(1H, br d, *J* = 5.9 Hz), 3.04(1H, d, *J* = 2.4 Hz), 2.54(1H, br d, *J* = 2.0 Hz), 2.51(2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.50(2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.30(2H, q, *J* = 7.3 Hz), 2.05(4H, q, *J* = 7.3 Hz), 2.01(2H, m), 2.00(4H, m), 1.64(4H, m), 1.39(4H, m), 1.38(2H, m), 1.35(2H, m), 1.32(6H, m), 1.31(2H, m), 1.30(2H, m), 1.26(4H, m), 1.23(14H, m); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 180.45(C), 170.11(C), 146.25(CH), 133.85(CH), 130.60(CH), 130.08(CH), 129.54(CH), 128.83(CH), 128.73(CH), 112.66(CH), 107.88(CH), 83.37(C), 80.58(C), 81.12(CH), 73.91(CH), 62.67(CH), 33.57(CH₂), 33.48(CH₂), 31.66(CH₂), 30.30(CH₂), 29.80(CH₂), 29.71(CH₂), 29.70(CH₂ x 2), 29.69(CH₂ x 2), 29.61(CH₂ x 2), 29.42(CH₂), 29.47(CH₂), 29.37(CH₂), 29.34(CH₂), 29.21(CH₂), 28.95(CH₂), 28.76(CH₂), 28.53(CH₂), 28.50(CH₂), 27.28(CH₂), 27.21(CH₂), 27.12(CH₂), 26.75(CH₂), 26.59(CH₂), 26.36(CH₂).

4. 4. 2. *Camminatus awashimensis*로부터 천연물의 추출 및 분리

4. 4. 2. 1. 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 flash chromatography

해면 *Camminatus awashimensis*(시료번호 94G-19)는 '94년 12월에 거제도 연안해역의 수심 15-20 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었으며 채집 즉시 드라이아이스로 냉동되어 그 상태에서 운송된 후 냉동고(-25°C)에서 보관되었다. 냉동보관중인 시료(수분포함한 무게량: 2 kg)를 해빙한 후에 잘게 자른 후에 추출용매 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었다. 추출용매로는 methanol 2 L와 methylene chloride 2 L를 각각 순서대로 두 번 사용하였으며 얻어진 추출물의 양은 methanol 층에서 37.4 g, methylene chloride층에서 2.5 g이 얻어졌다. 이렇게 추출하여 얻어진 조추출물을 다시 모은 후에 n-butanol과 물의 분획(1:1 혼합액, 2 L)을 이용하여 염과 기타 극성물질을 제거하였다. 얻어진 조추출물의 양은 n-butanol층에서 22.6 g이었다. 이 혼합물들은 다시 10% methanol 수용액과 n-hexane층으로 분배(1:1 혼합액, 2 L)하였으며 수용액층과 n-hexane층에서 얻어진 양은 각각 11.6 g과 6.8 g이었다.

n-Hexane층에서 얻어진 조추출물중에서 3.4 g을 취하여 silica 고속 감압 크로마토그래피를 실시하였으며 용매로는 n-hexane과 ethyl acetate의 혼합액(10% EtOAc/n-hexane으로부터 100% EtOAc까지), acetone, methanol을 순서대로 용출하였다. 이렇게 얻어진 13개의 분획(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-12(90% EtOAc/n-hexane)과 fx-13(100% EtOAc)에 포함되어 있음이 확인되었다.

4. 4. 2. 2. Cyclitol 유도체들의 분리

고속감압 실리카 크로마토그래피로 분리한 fx-12(10 mg)과 fx-13(80 mg)을 100% methanol에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 reversed phase HPLC(Capcell pak C₁₈ column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 ml/min)에 의하여 분리하였다. Retention time 38.0, 38.8, 39.6, 40.8, 44.4, 46.4, 48.0분에서 모두 7개의 물질이 2.1, 3.3, 8.5(94G-19-A), 5.6, 2.3, 6.2, 4.4 mg으로 얻어졌다. 이 물질들의 스펙트럼은 서로 거의 차이가 없었다.

94G-19-A; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.16(1H, q, J = 5.1 Hz, H-2), 3.91(1H, t, J = 6.1 Hz, H-2'), 3.88(1H, t, J = 6.1 Hz, H-4'), 3.80(1H, t, J = 6.4 Hz, H-3'), 3.77(1H, dd, J = 10.9 and 4.4 Hz, H-1), 3.70(1H, dd, J = 10.9 and 5.7 Hz, H-1), 3.66(1H, t, J = 6.4 Hz, H-4'), 3.64(1H, t, J = 6.1 Hz, H-1'), 3.57(1H, dd, J = 11.1 and 4.1 Hz, H-3), 3.53(1H, dd, J = 11.1 and 4.7 Hz, H-3), 3.45(1H, dt, J = 9.2 and 6.4 Hz, H-1''), 3.40(1H, dt, J = 9.2 and 7.1 Hz, H-1''), 2.33(2H, t, J = 7.0 Hz, H-2'''), 1.61(4H, m), 1.53(2H, m, H-2''), 1.26(46H, m), 1.07(2H, m, H-9'', -11''), 0.87(3H, t, J = 7.0 Hz), 0.86(3H, t, J = 7.0 Hz), 0.83(3H, d, J = 6.5 Hz); ¹³C

NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 173.88(C, C-1'''), 82.63(CH, C-1'), 80.77(CH, C-3'), 79.44(CH, C-4'), 79.29(CH, C-5'), 73.56(CH, C-2'), 72.02(CH₂, C-1''), 71.04(CH, C-2), 70.01(CH₂, C-1), 68.89(CH₂, C-3), 37.15(CH₂), 34.48(CH₂, C-2'''), 32.81(CH), 32.00(CH₂), 30.08(CH₂), 29.74(CH₂), 29.69(CH₂), 29.54(CH₂), 29.52(CH₂), 29.37(CH₂), 29.34(CH₂), 29.17(CH₂), 27.15(CH₂), 27.09(CH₂), 26.05(CH₂), 25.01(CH₂), 22.74(CH₂), 19.75(CH₃), 14.17(CH₃); HMFABMS [M + Na]⁺ observed 709.5560, C₄₀H₇₈O₈Na requires 709.5594.

4. 4. 2. 3. 제주도에서 채집한 미확인종(96X-1)으로부터 분리된 cyclitol의 deacyl 유도체
(=96X-1-A)

해면 (시료번호 96X-1)은 '91년 2월에 제주도 서귀포 연안해역의 수심 20-25 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었으며 이 시료는 채집한 즉시 냉동하여 그 상태에서 보관되었다. 냉동보관중인 시료(수분포함한 무게량: 5 kg)를 해빙한 후에 잘게 자른 후에 추출용매 5 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었다. 추출용매로는 methanol 5 L와 methylene chloride 5 L를 각각 순서대로 두 번 사용하였으며 이렇게 추출하여 얻어진 조추출물을 같이 모은 후에 n-butanol과 물을 이용하여 분배하였으며 이 butanol층은 다시 15% methanol 수용액과 n-hexane층으로 다시 분배하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물의 양은 15% methanol 수용액과 n-hexane층에서 각각 21.14 g과 41.52 g이었다.

15% methanol 수용액층에서 얻어진 조추출물중에서 8.79 g을 취하여 C₁₈ 고속 감압 크로마토그래피(YMC ODS 400mesh)를 실시하였으며 용매로는 30, 20, 10% methanol 수용액과 100% methanol을 사용하였다. Methanol 분획에서는 1.75 g이 얻어 졌으며 이 분획을 다시 silica 고속 감압 크로마토그래피로 분리하였다. 용매로는 30% EtOAc/Hexane에서부터 10%씩 함량을 증가시켜 100% EtOAc까지 사용하였으며 100% acetone과 100% methanol을 추가로 사용하였다. 이렇게 해서 얻어진 분획들의 수소 NMR을 측정한 결과 100% methanol분획에서 cyclitol이 존재하는 것으로 생각되었으며 얻어진 양은 0.73g이었다. 이중에서 0.51 g을 취하여 pyridine 3 ml에 녹이고 acetic anhydride 2ml를 가하여 실온에서 12시간 정도 반응시켰다. 용매를 제거한 후에 남은 물질을 100% methanol에 녹이고 reversed-phase HPLC(YMC C₁₈ column, 2 x 25 cm, RI detector, eluent 100% methanol, 2 ml/min)로 분리하였다.

96X-1-A: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.31(1H, dd, J = 5.6 and 5.6 Hz, H-4'), 5.11(1H, dd, J = 3.9 and 3.9 Hz, H-5'), 5.10(1H, dd, J = 4.9 and 4.9 Hz, H-3'), 5.08(1H, dd, J = 6.4 and 6.4 Hz, H-4'), 5.03(1H, quintet, J = 5.1 Hz, H-2), 3.72(1H, dd, J = 10.8 and 4.3 Hz, H-1), 3.62(1H, dd, J = 10.8 and 5.8 Hz, H-1), 3.50(2H, m, H-3), 3.42(1H, dt, J = 9.3 and 6.8 Hz, H-1''), 3.37(1H, dt, J = 9.3 and 6.8 Hz, H-1''), 1.52(2H, quintet, J = 6.8 Hz, H-2''), 1.32(2H, m, H-10''), 1.25(2H, m, H-15''), 1.23(22H, m, H-3''~9'', H-11''~13''), 1.05(2H, m, H-9'', -11''), 0.86(3H, t, J = 7.3 Hz), 0.81(3H, d, J = 6.8 Hz); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 170.40(C, CO),

170.12(C, CO), 170.03(C, CO), 169.71(C, CO), 79.62(CH, C-1'), 77.76(CH, C-3'), 77.45(CH, C-4'), 77.39(CH, C-5'), 73.38(CH, C-2'), 71.71(CH₂, C-1''), 71.43(CH, C-2), 69.33(CH₂, C-1), 68.80(CH₂, C-3), 37.10(CH₂ x 2, C-9''), 32.75(CH, C-10''), 31.95(CH₂, C-14''), 30.02(CH₂), 29.68(CH₂ x 2), 29.63(CH₂), 29.57(CH₂), 29.49(CH₂, C-2''), 27.08(CH₂, C-8''), 26.04(CH₂, C-3''), 22.69(CH₂, C-15''), 21.08(CH₃), 20.82(CH₃), 20.78(CH₃), 20.75(CH₃), 20.68(CH₃), 19.71(CH₃, C-17''), 14.11(CH₃, C-16'').

917-1-Hex2-comb1-TP14-P

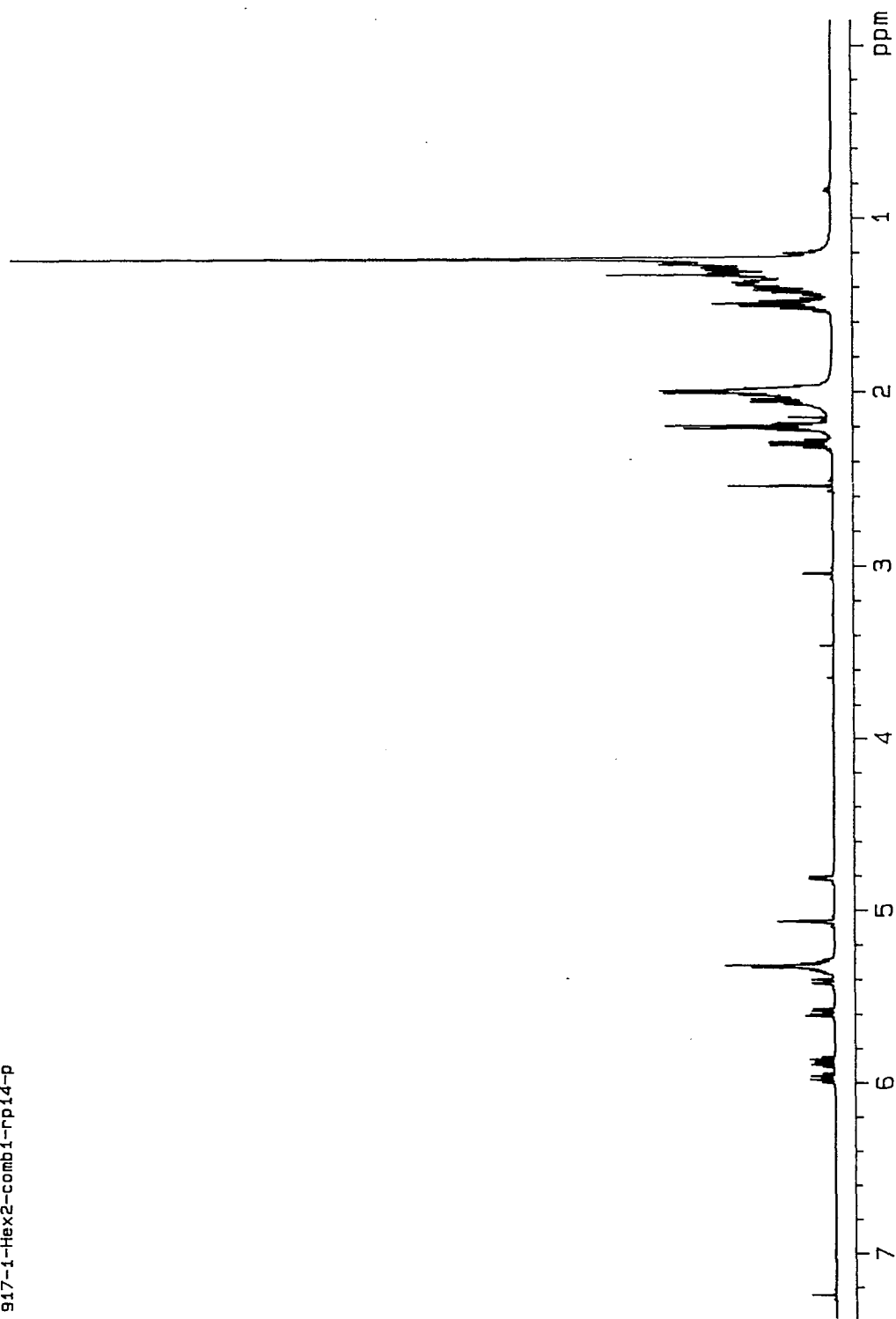


Fig. 4-5. Proton NMR spectrum of 917-1-I.

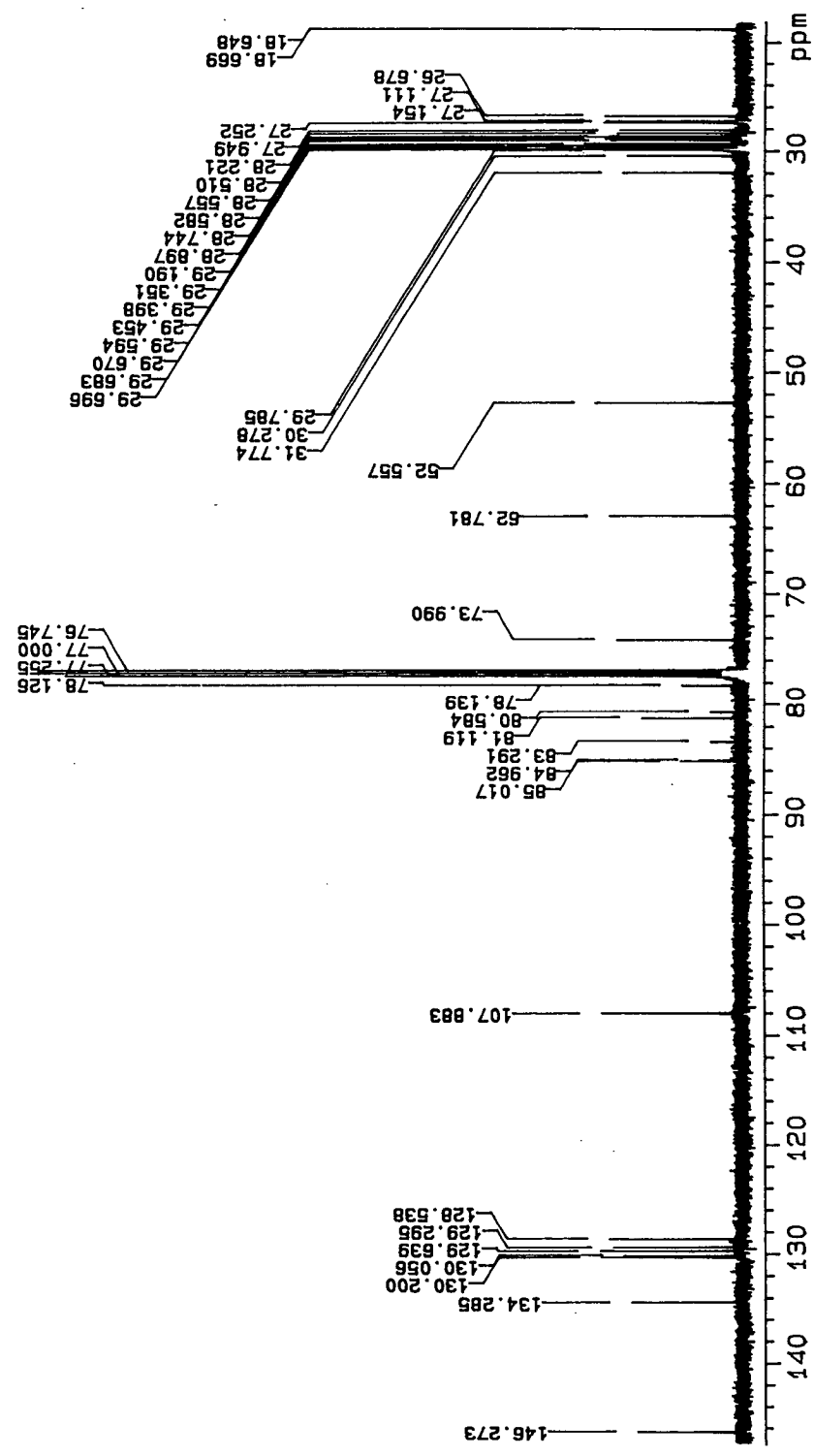


Fig. 4-6. Carbon NMR spectrum of 917-1-1.

917-1-nfc5-np8-rp6-cosy45

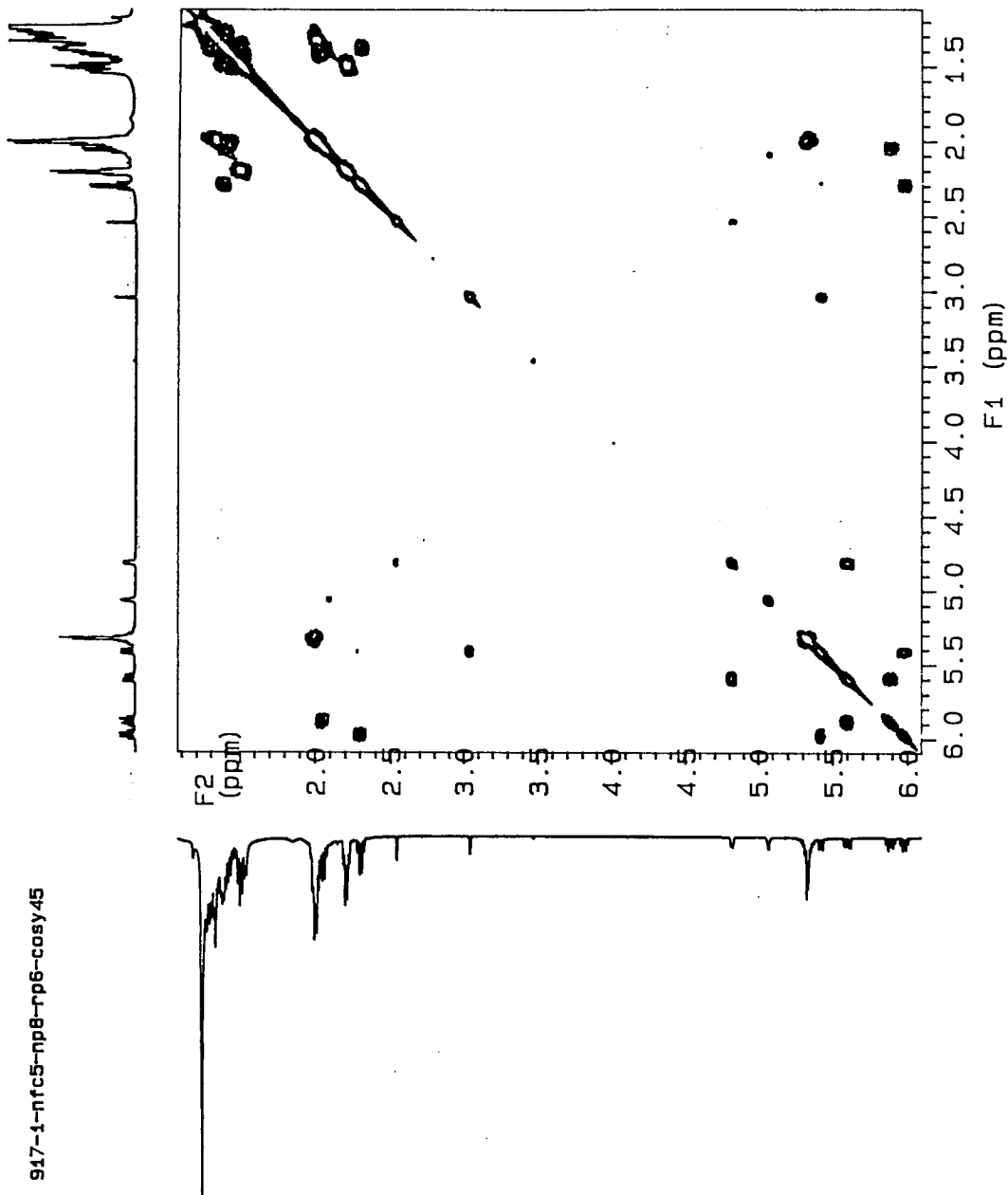


Fig. 4-7. Proton COSY spectrum of 917-1-I.

917-1-Hex2-comb1-rp17-p

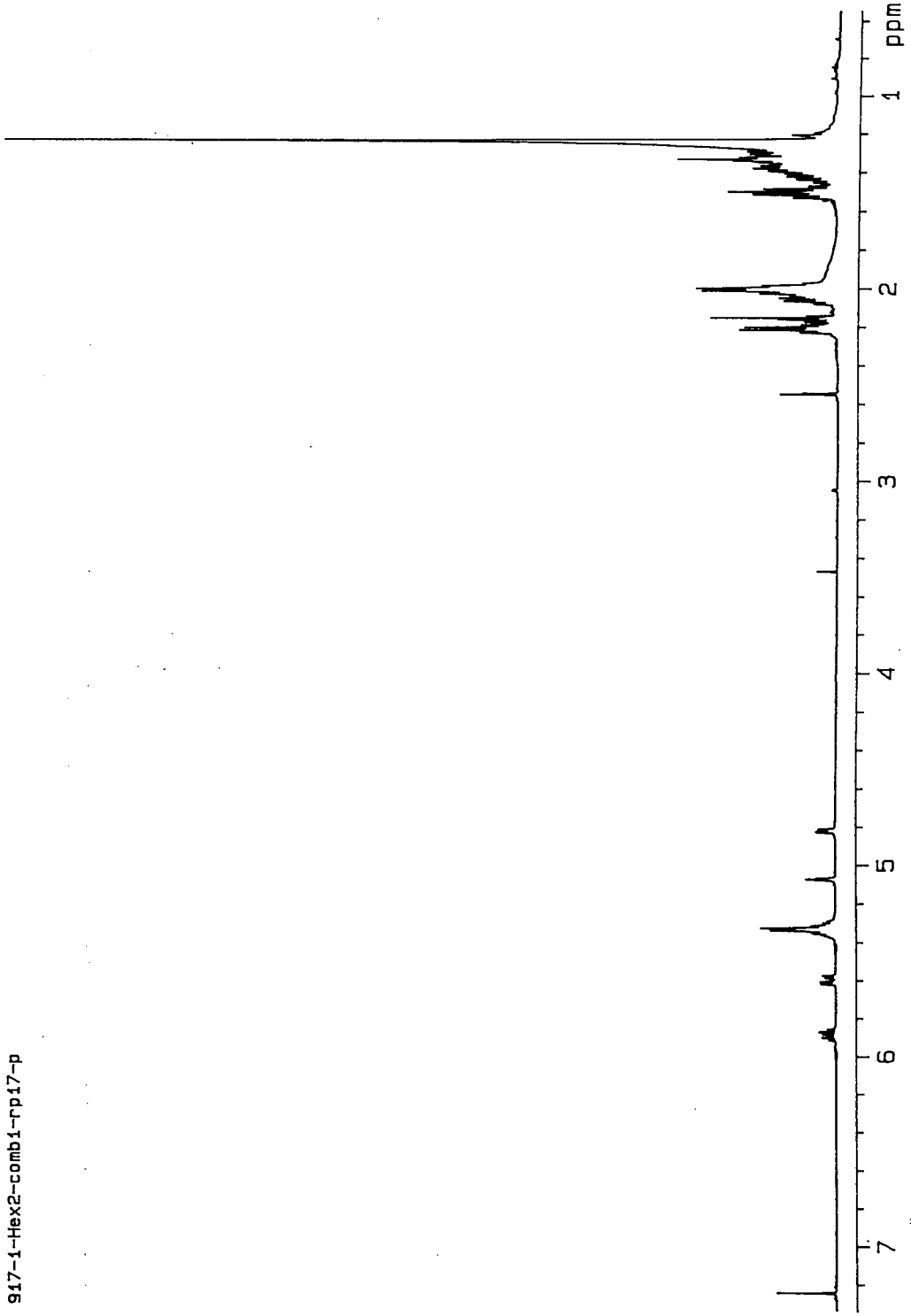


Fig. 4-8. Proton NMR spectrum of 917-1-Q.

917-1-Hex2-comb1-rp17-c

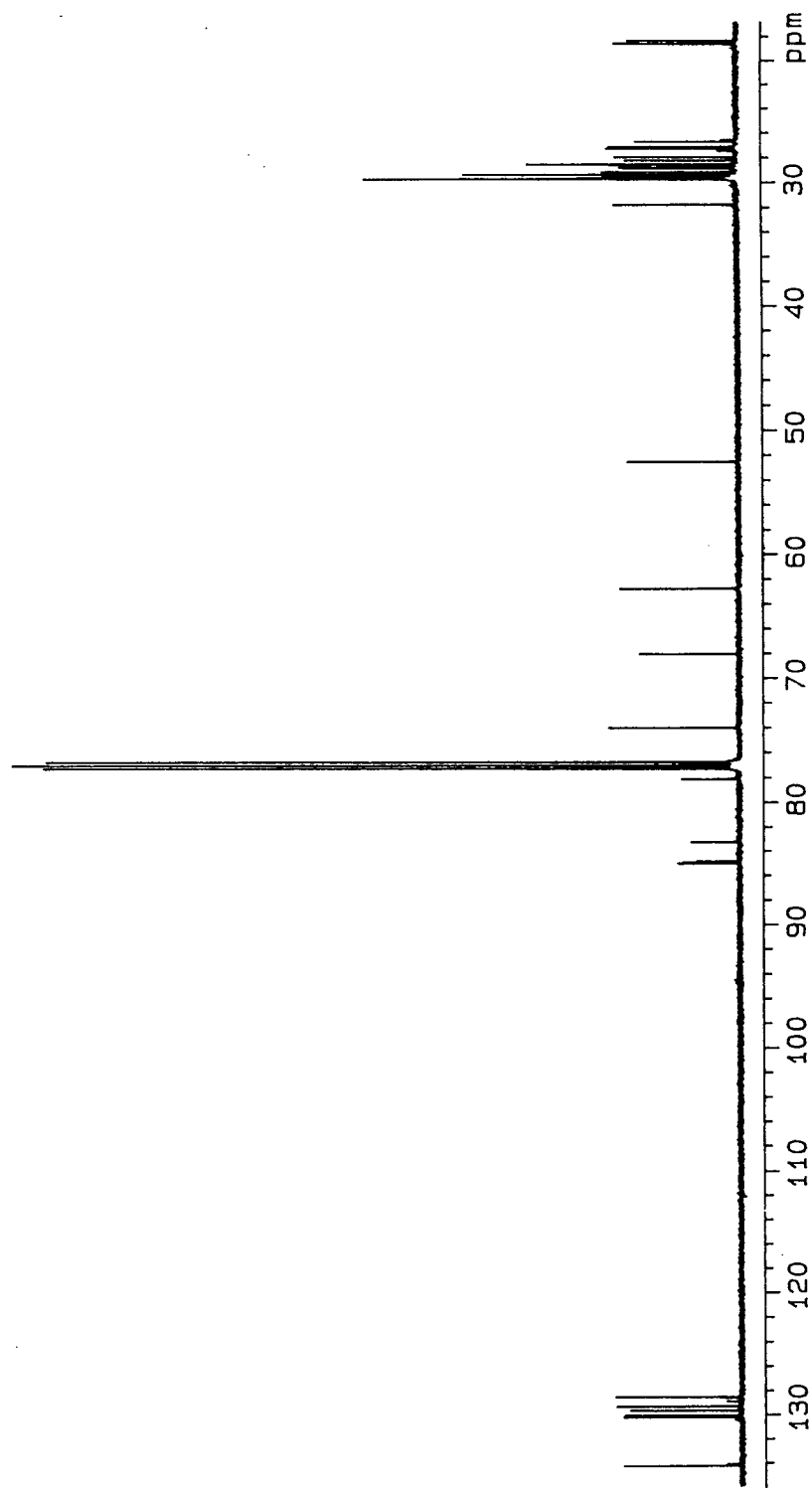


Fig. 4-9. Carbon NMR spectrum of 917-1-Q.

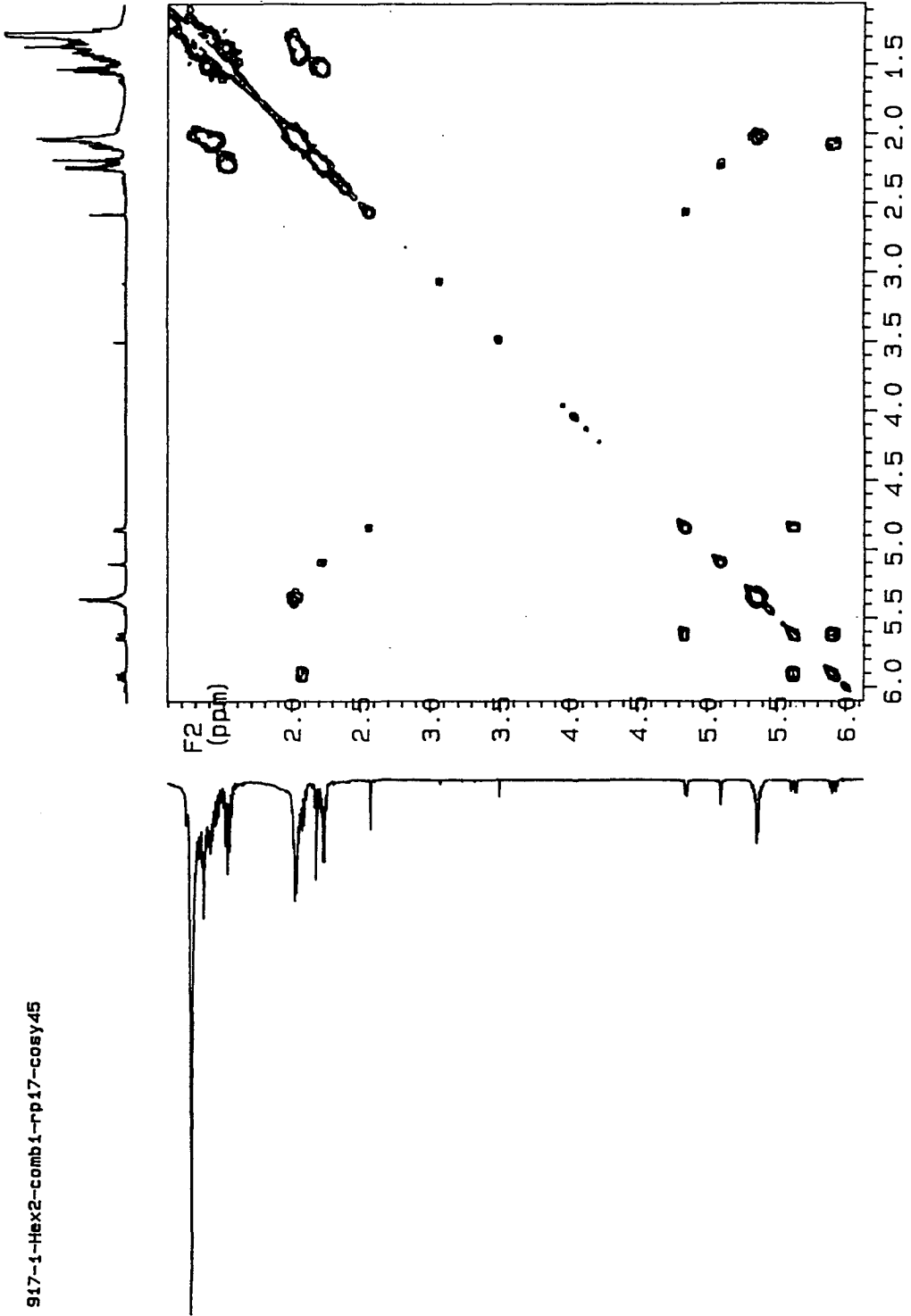


Fig. 4-10. Proton COSY spectrum of 917-1-Q.

917-1-Hex2-comb1-pp18-p

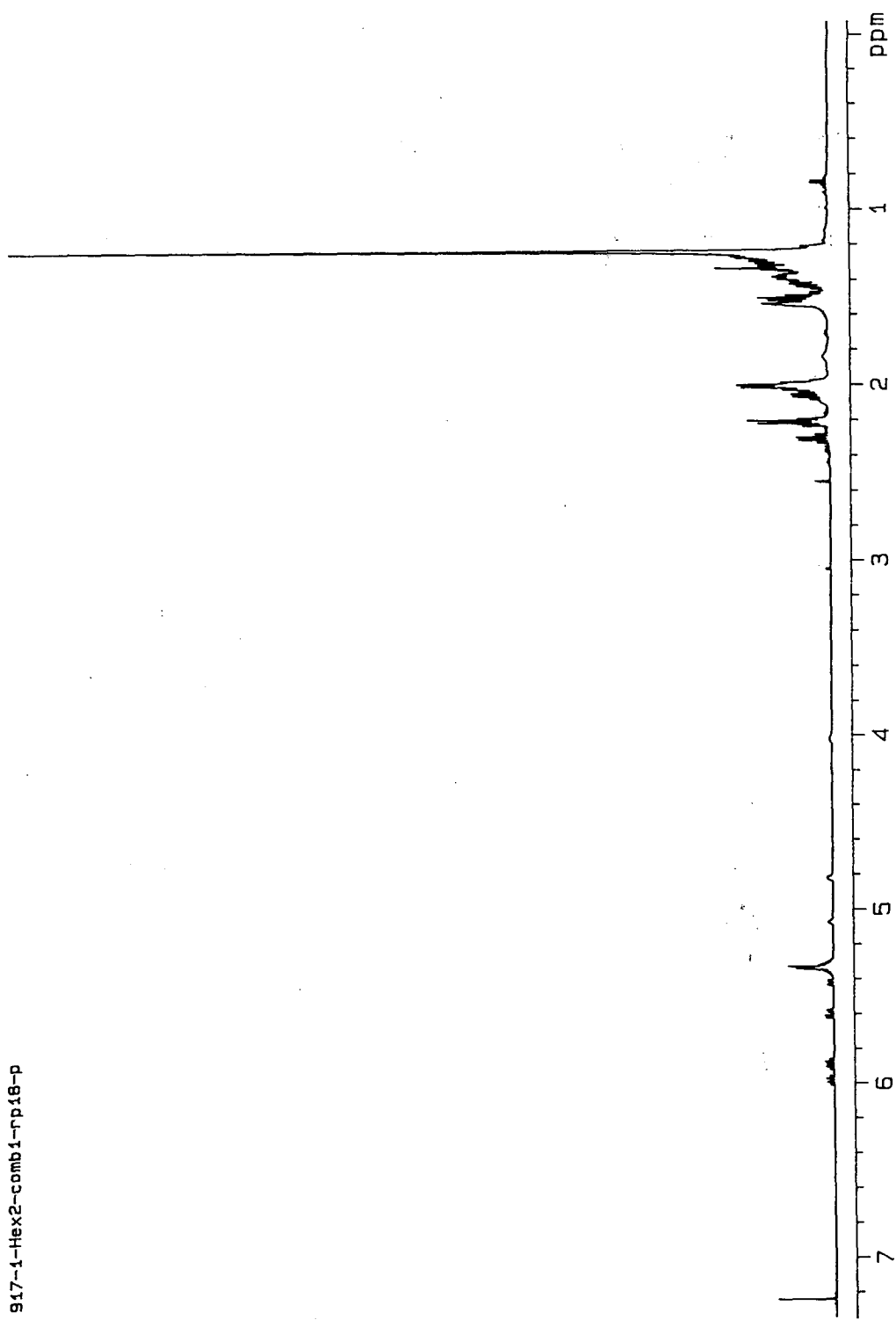


Fig. 4-11. Proton NMR spectrum of 917-1-R.

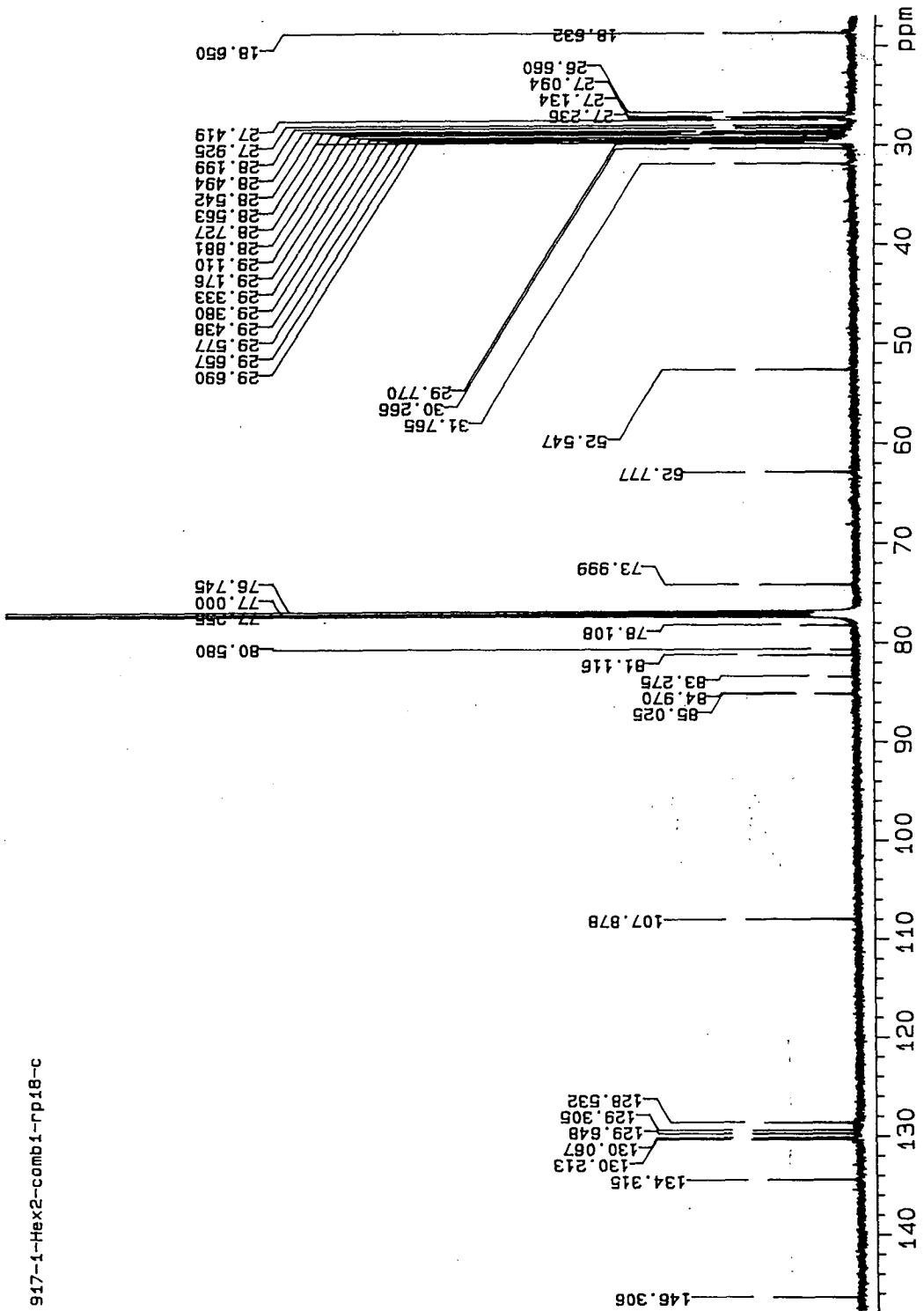


Fig. 4-12. Carbon NMR spectrum of 917-1-R.

917-1-Hex2-comb1-rp18-cosy45

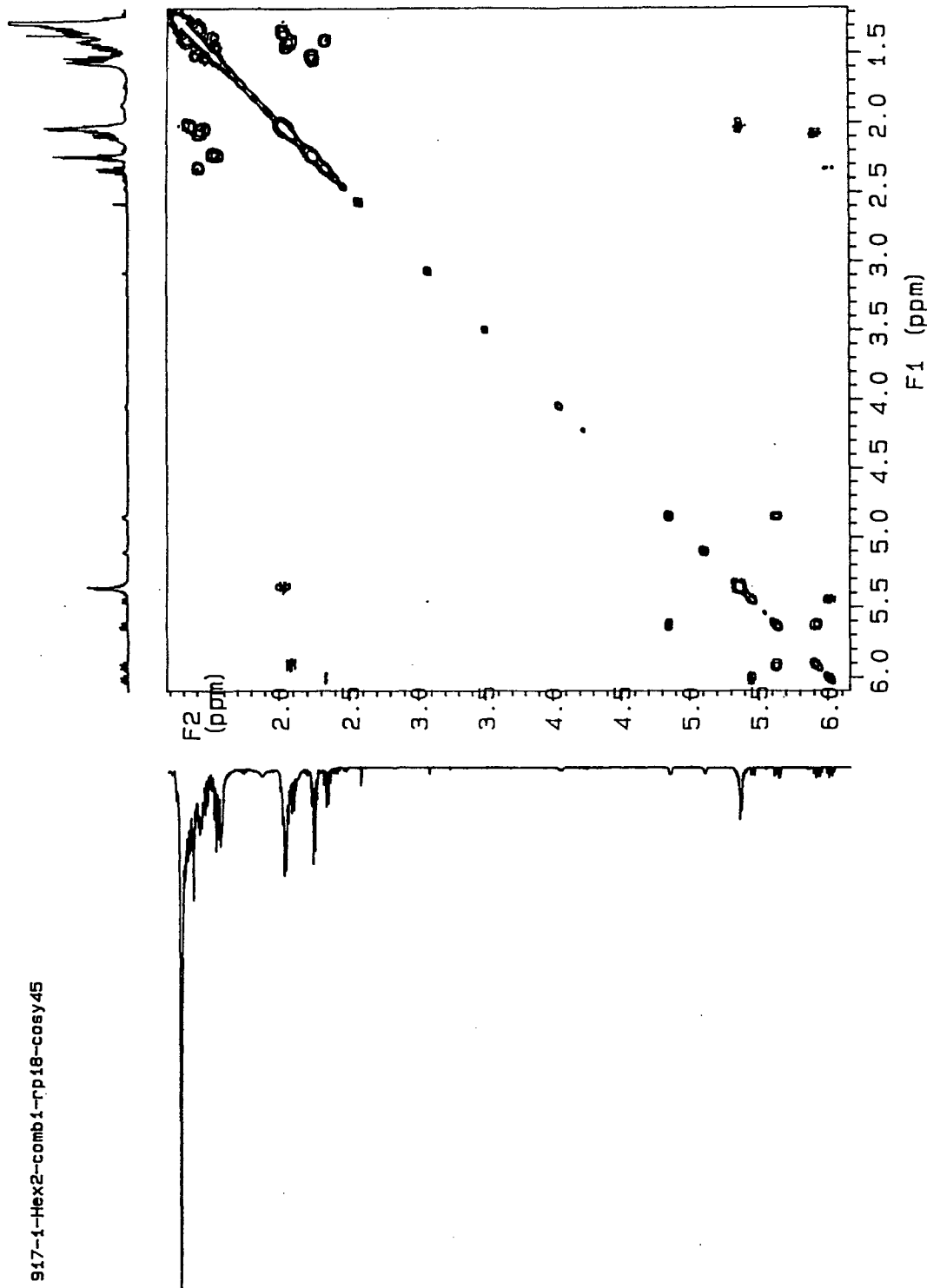


Fig. 4-13. Proton COSY spectrum of 917-1-R.

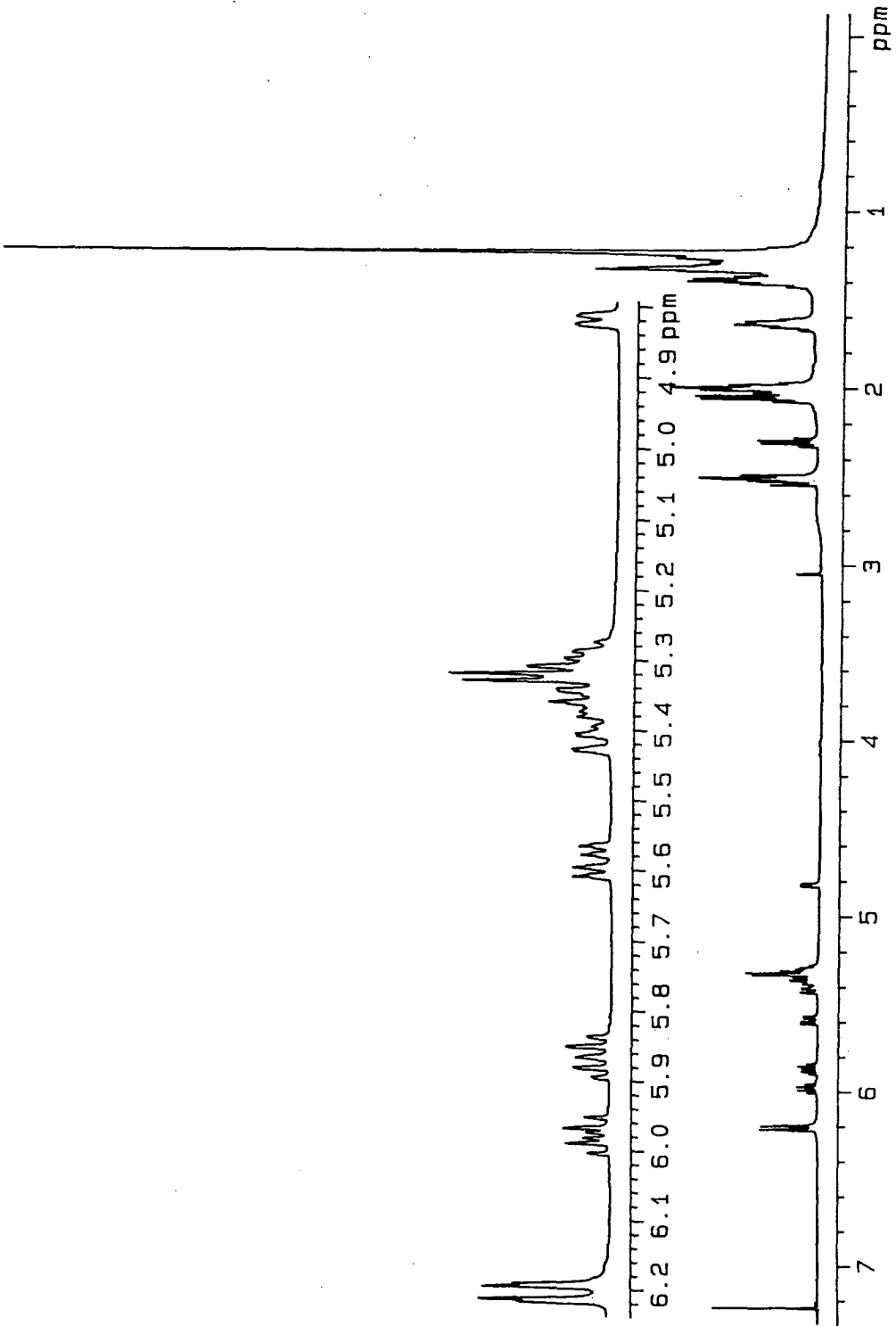


Fig. 4-14. Proton NMR spectrum of 917-1-J.

917-1-Hex-2-nfc40-45XEt-np9-rp5-c

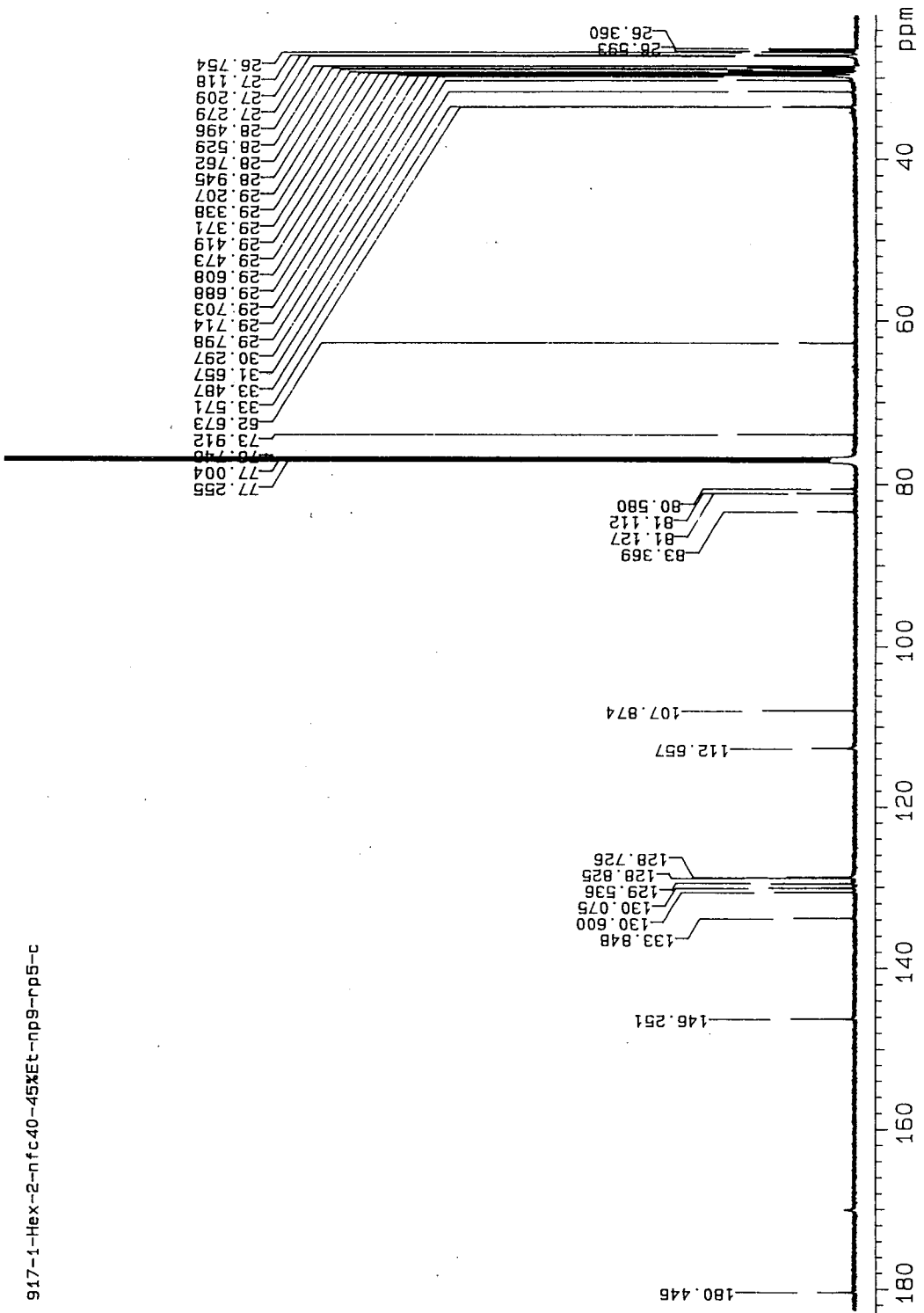


Fig. 4-15. Carbon NMR spectrum of 917-1-J.

917-1-Hex-2-40-45%EtOAc-np8-mp5-cosy45

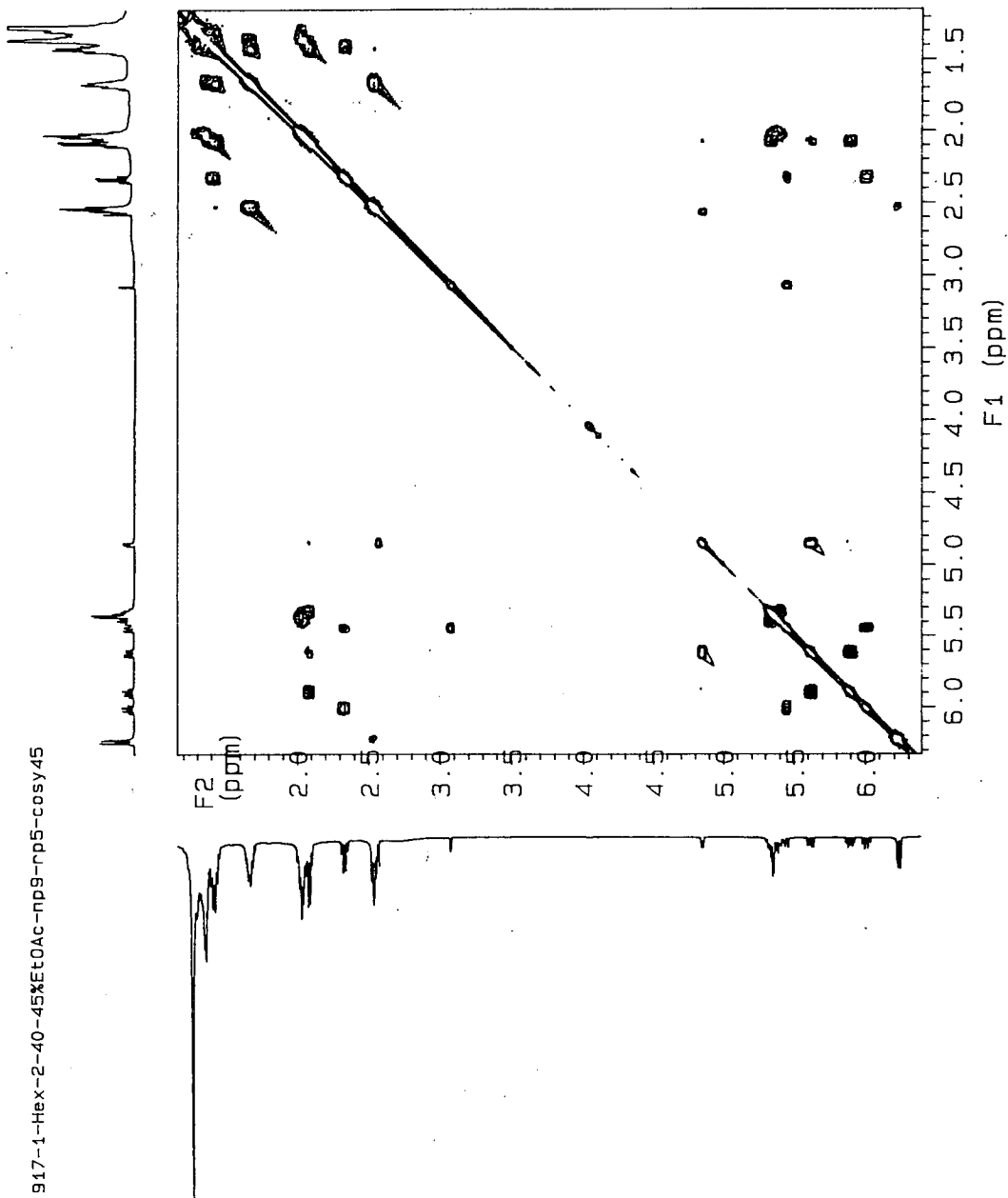


Fig. 4-16. Proton COSY spectrum of 917-1-J.

946-19-nfc-Et+Ac-rhs-rh4-p

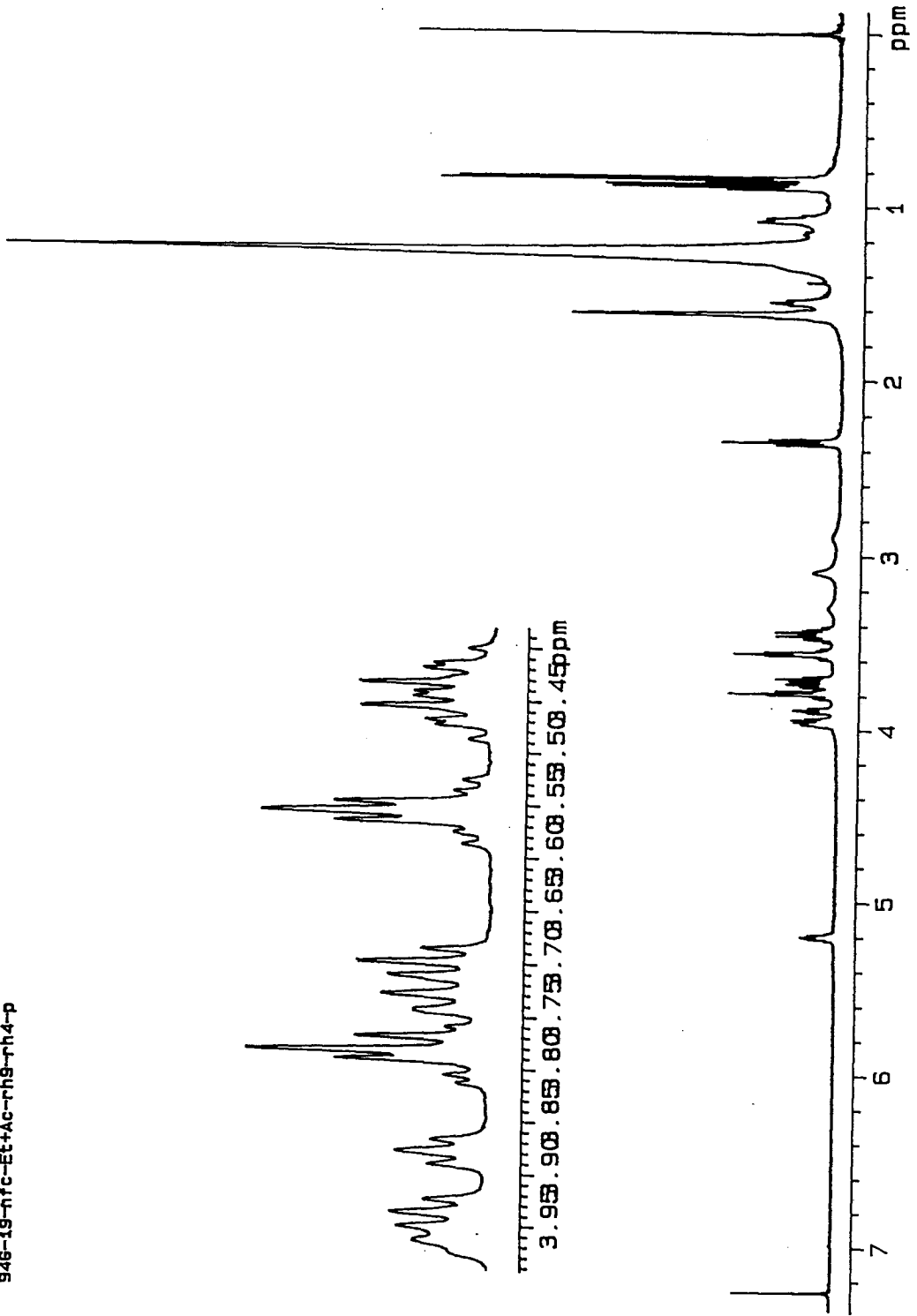


Fig. 4-17. Proton NMR spectrum of 94G-19-A.

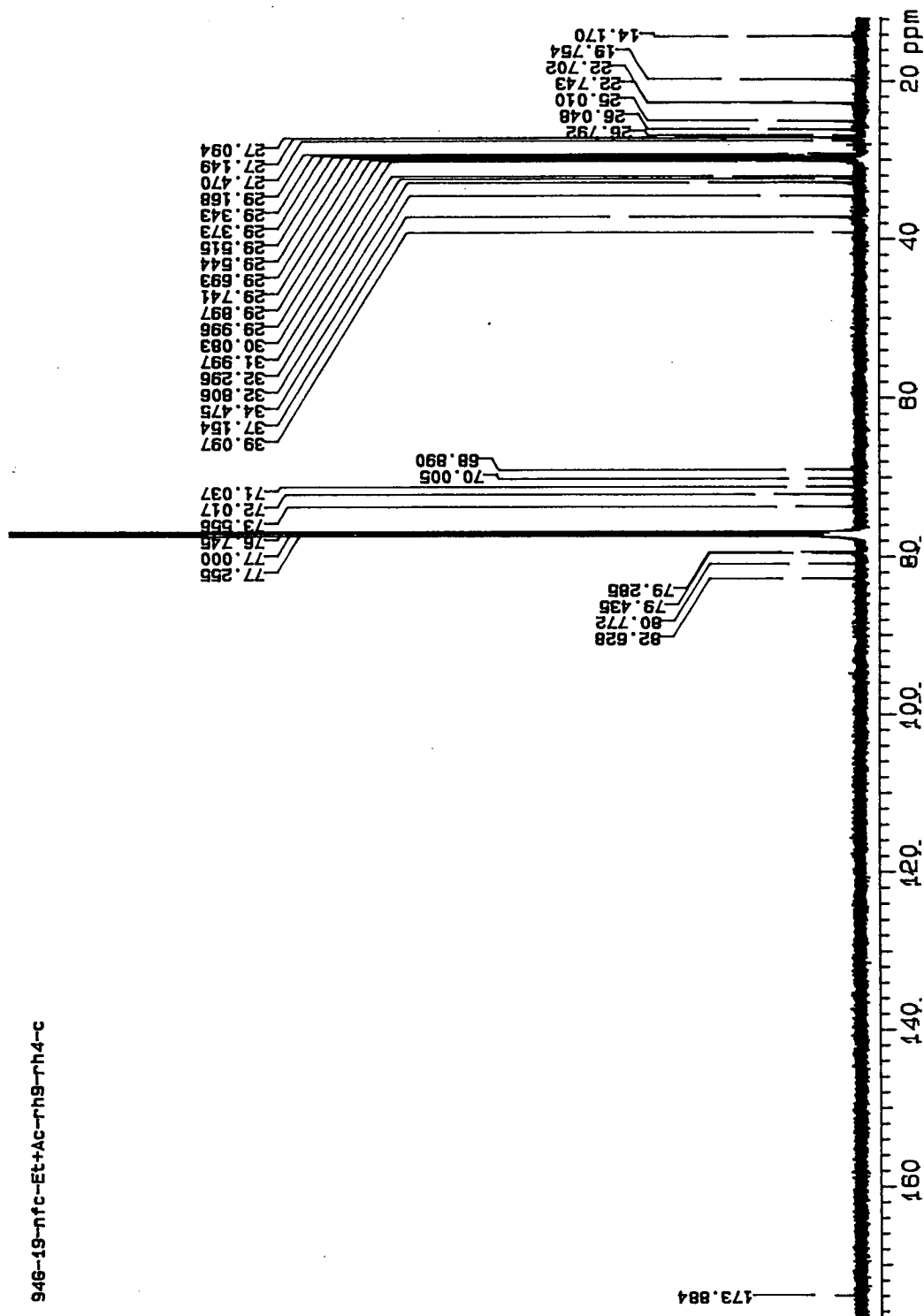


Fig. 4-18. Carbon NMR spectrum of 94G-19-A.

94G-19-nfc-Et+Ac-rh9-rh4-cosy45

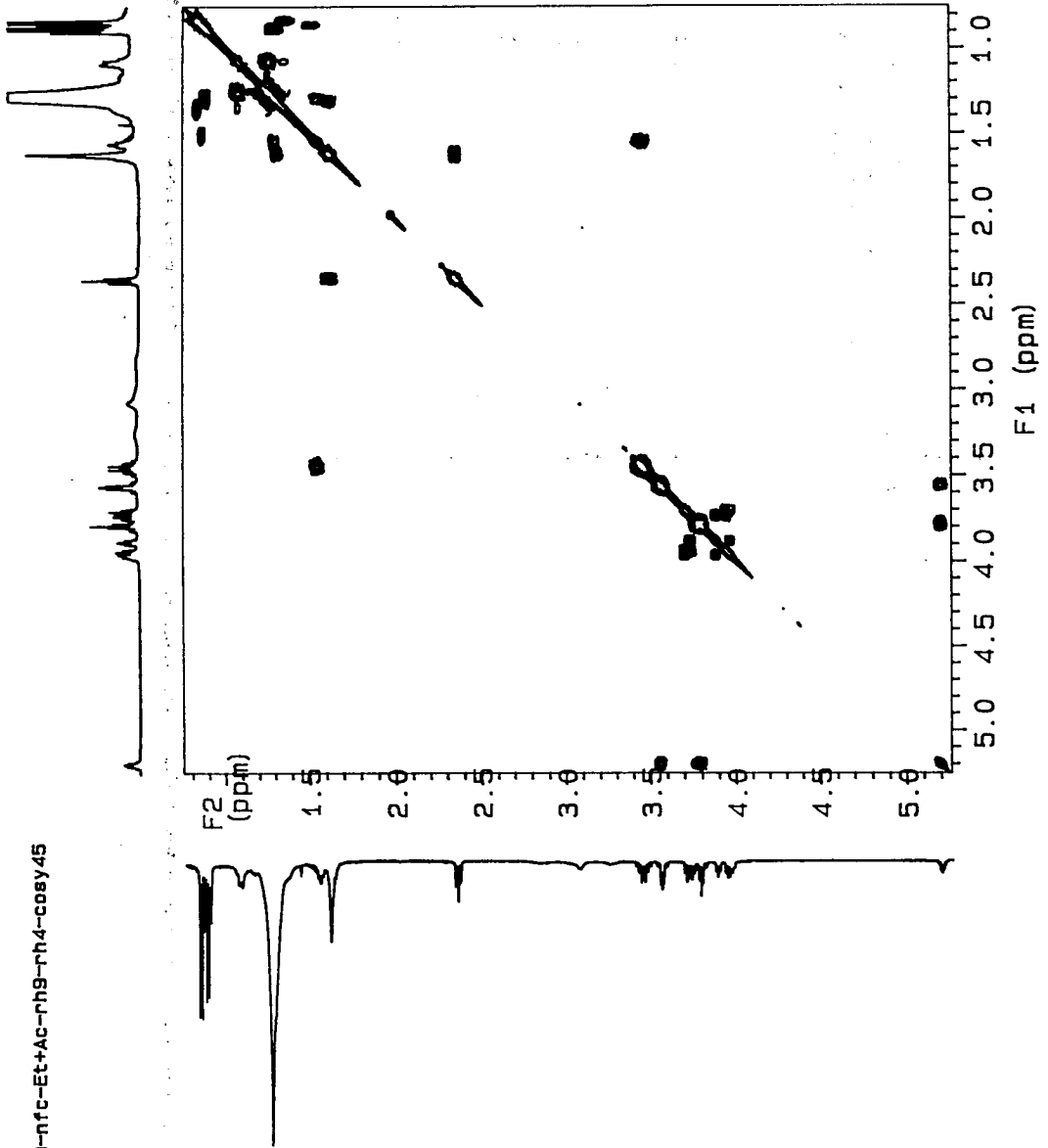


Fig. 4-19. Proton COSY spectrum of 94G-19-A.

917-1-3-nfcMeOH-Ac-rp9-p

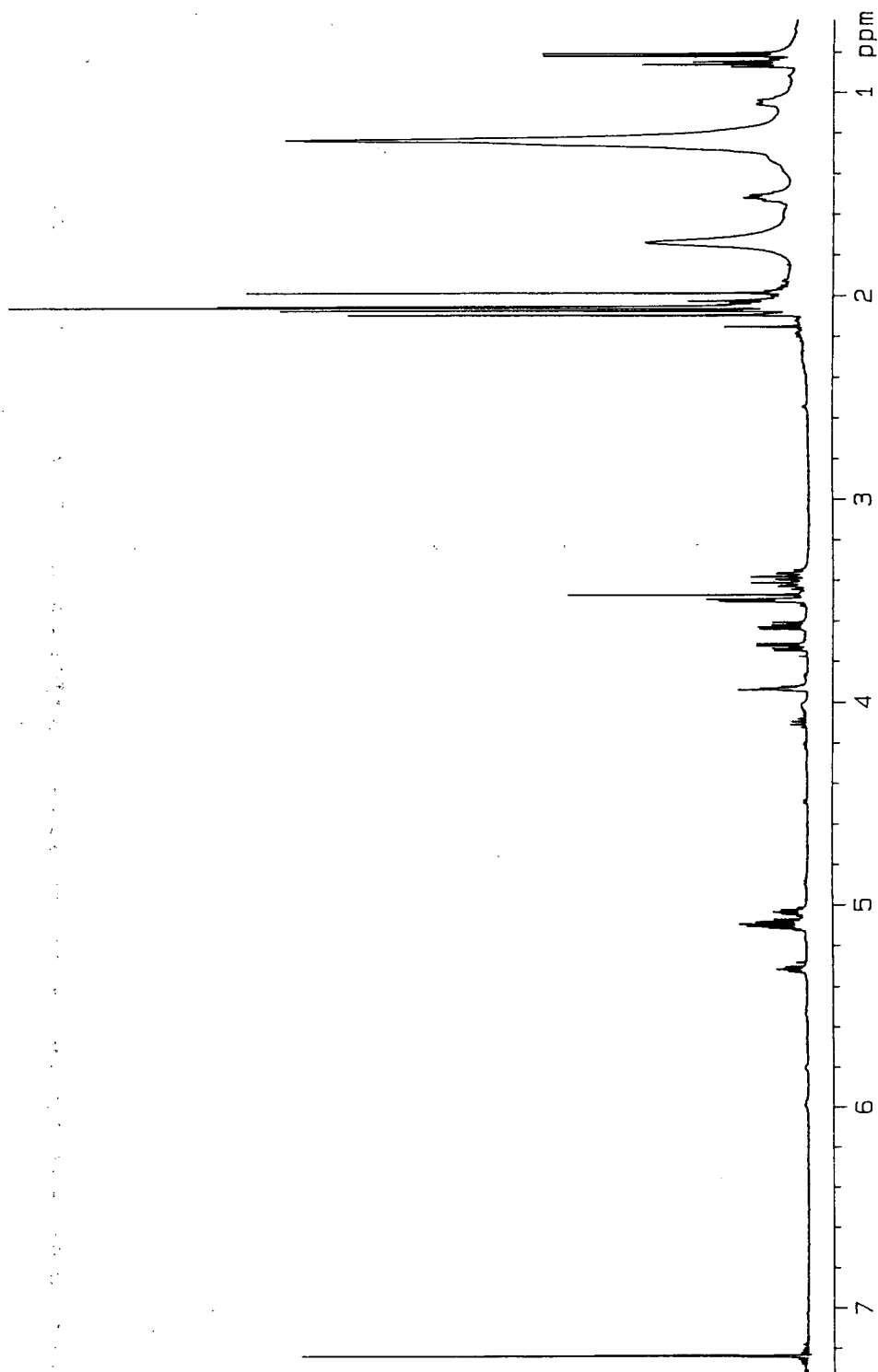


Fig. 4-20. Proton NMR spectrum of 96X-1-A.

917-1-3-nfcMeOH-Ac-rp9-c

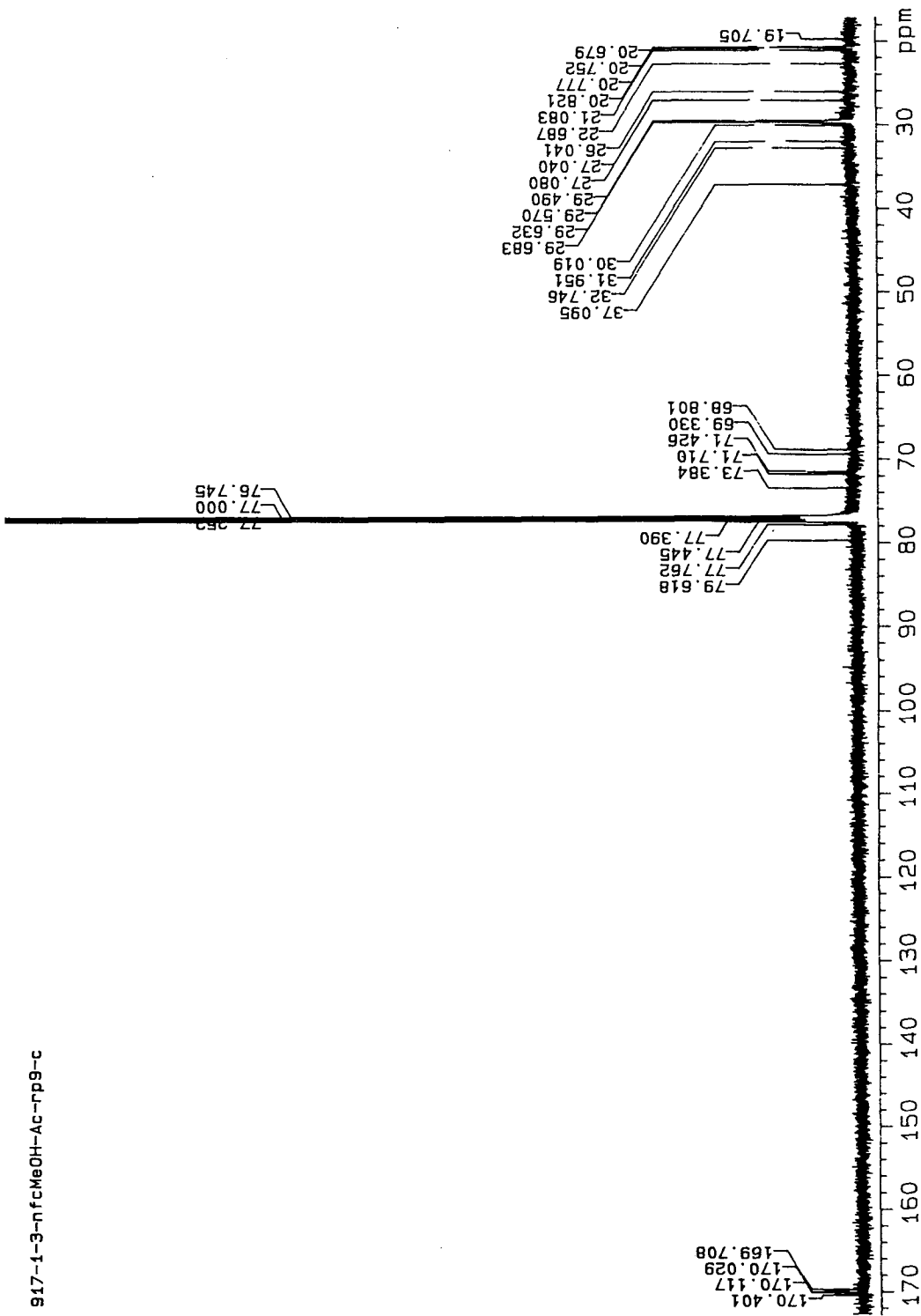


Fig. 4-21. Carbon NMR spectrum of 96X-1-A.

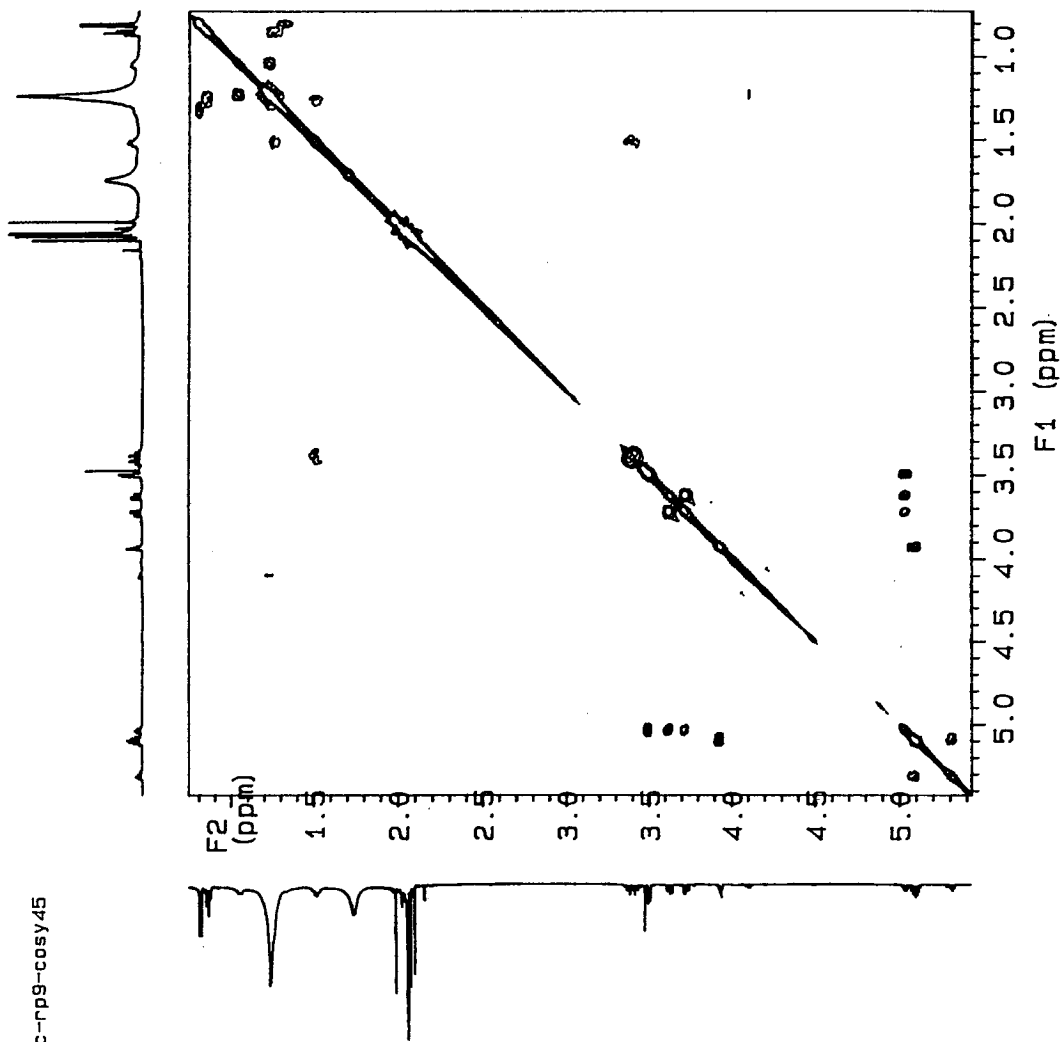


Fig. 4-22. Proton COSY spectrum of 96X-1-A.

제 5 장 해양미생물로부터 유용효소 분리 정제

5. 1. 서론

해양생물로부터 신물질 및 유용물질을 생산하는데는 생물 그 자체가 생산하는 물질을 대상으로 할수도 있으나 이 경우 매년 다량의 시료가 필요하므로 실제 생산을 위해서는 지속적인 대량의 시료공급이 필요하다. 그러나 실제로 어패류를 제외한 대부분의 해양생물 시료는 지속적으로 대량의 시료를 공급한다는 것이 대단히 어려운 문제이다. 따라서 본 과제에서는 해양 생물에 대한 연구와 함께 실험실에서 대량 배양이 가능한 미생물에 의해 생산되는 유용물질에도 주안점을 두고 연구를 수행하였다. 특히 여러종류의 해양생물에서 처음 보고된 대사물질들이 해양생물들에 기생 혹은 공생 관계에 있는 미생물에 의해 생산된다는 사실이 밝혀진 예가 적지 않다.

미생물의 경우 순수한 형태로 분리된 균주는 일단 배양 조건만 수립되면 원하는 시기에 신속하게 필요한 양의 균체를 유용물질의 원료로서 공급할수 있으며 생산 작업의 규모도 Fermentation 등을 이용하여 필요한 대로 증대시킬 수 있다는 장점이 있고 아울러 균주개량등을 통하여 생산량을 증대시킬 수도 있다. 또한 미생물 특히 세균의 경우 유전자 검색 및 조작 기술이 비교적 잘 확립되어있으며 그 genome 크기가 작아 고난도의 기술없이도 유전자 조작의 가능성도 열려있다는 점도 장점으로 꼽을 수있다.

다양한 해양환경에 서식하고 있는 해양생물에 공생 혹은 공존하는 미생물과 단독으로 서식하는 미생물들을 대상으로 균주를 순수 분리, 보존하고 이들을 대상으로 산업적으로 활용도가 높은 효소들의 생산 여부를 검색하고 배양량당의 효소 역가 검사를 통하여 활성도가 높은 효소원을 확보하였다. 이렇게 확보된 효소원을 이용하여 효소생산의 최적 조건을 수립하고 해당 효소를 분리 정제하고 그 응용분야를 개발한다. 아울러 수집된 균주를 대상으로 항세균 및 항진균 활성도를 검색하여 활성도가 발견된 균주들을 대량 배양하고 이로부터 항세균 및 항진균 활성도를 보이는 물질을 순수 분리하여 구조 결정을 통하여 신물질 여부를 확인하는 한편, 항종양, 항바이러스 등의 활성도 여부를 검색하였다.

이렇게 분리 확보된 균주들은 현단계에서의 신물질 및 유용물질의 생산자로서의 가능성 뿐만아니라 비교적 보존이 용이하므로 장래에 현재 여건에서 검색할 수 없는 새로운 생리활성물질의 원천으로서 소중한 자산의 의미를 지니고 있기도하다.

5. 2. 해양 미생물 균주 분리 및 보존

5. 2. 1. 균주수집

균주 수집 대상원은 주로 무척추 해양동물 및 해양 식물 그리고 해수와 해저 침전물 등을

대상으로 해양 방선균 및 일반 해양 세균 균주를 분리하였다. 해양동식물의 경우는 해양천연물을 분리하기 위한 해양생물을 채집하는 현장에서 SCUBA에 의하여 얻어진 생물 시료를 약 1 g 씩 취하여 미리 준비된 멸균된 해수를 2 ml씩 가하여 잘게 분쇄한뒤 이를 평판 배지에 순차적으로 도말하는 방법으로 해양생물 공생 미생물등 생물체내에 함유된 균주를 분리하였다.

균주를 분리하기 위한 배지로서는 세균의 경우는 주로 ZoBell 배지와 sea water complete 배지를 사용하였고 방선균의 경우는 변형된 Bennett's 배지, ISP-4 배지, Starch-casein KNO₃ 배지, Chitin 배지등을 사용하였다. 현재까지 분리되어 유용물질에 대한 1 차 검색을 마친 뒤 보존된 균주수는 방선균의 경우 약 2,000 주, 일반 세균의 경우 약 1,700여 주를 확보하였다 (Table 5-1). 최근에는 일반 세균 보다 해양 유래 방선균의 수집에 주력하고 있다. 그리고 이들로부터 phospholipase, lipase, superoxide dismutase, haloperoxidase 등의 유용효소 생산과 항세균 활성 및 항진균 활성을 검색하였고 그 결과는 Table 5-2에 요약하였다.

5. 3. 유용효소 검색 및 분리 정제

5. 3. 1. Phospholipase A₁

Lipase는 가수분해, 에스테르화, 트랜스에스테르화 반응들을 촉매하는데 반응에 조효소 및 ATP등의 energy원이나 NADH와 같은 electron donor를 필요로 하지않고 상대적으로 여타 효소들에 비해 열 및 유기 용매에 안정하며 우수한 입자선택성 (stereospecificity)을 갖고 있어 지방으로부터 지방산의 생산이나 enantiomer합성등에 많이 이용되고 있다. 실제로 많은 chiral 약품들이 한종류의 enantiomer 만이 치료에 유용하며 반대의 enantiomer는 효과가 없거나 심지어는 독성을 나타내는 경우도 있어 enantiomer들이 섞여 있는 약품의 수요가 점차 순수한 enantiomer에 대한 수요로 대체되고 있다. 화학적 합성의 경우 이러한 특정 종류의 enantiomer를 선택적으로 합성하는데 어려움이 있고 합성후 특정 enantiomer를 선택적으로 분리하는데도 많은 노력이 필요하다. 현재 이러한 enantiomer들의 합성에 효소, 특히 lipase의 사용이 새로운 가능성으로 대두되고 있다. Lipase는 이외에도 소화제, 세제등에 광범위하게 사용되고 있다.

Phospholipase A₂ 는 여러 종류의 세균이나 고등 동물의 독소의 중요한 부분을 구성하고 있고 sn-2 위치의 지방산을 교체하거나 제거한 새로운 인지질등의 합성에 사용되는 유용한 효소이다 (Hosokawa et al., 1993). 이렇게 sn-2 위치의 지방산을 제거한 인지질 (lysophospholipid)는 천연 소재의 유화제로서 가치가 높을 뿐아니라 sn-2 위치에 arachidonic acid를 갖고 있는 인지질의 경우 본 효소에 의하여 유리된 arachidonic acid가 eicosanoid라고 통칭되는 세포활성 조절물질로서 그 중요성이 높다.

지방산은 공업적으로 계면활성제, 세제, 고무산업, 도료 또는 vitamine이나 색소의 운반체등의 기본 소재로서 그 응용도가 높다. 따라서 일반 지방으로부터 지방산의 효율적인 생산은 공법

Table 5-1. Isolation of marine bacteria and actinomycete from Marine environments.

Date	Sampling site	Actinomycete	Bacteria
1994.4	Sari	12	56
1994.5	Yellow-sea	77	130
1995.3	East sea	145	275
	ChoomoonJin		280
	Sokcho		240
1995.4.	South Sea	107	260
1995.5.	East sea		256
	Sokcho		170
1995.7	Antartic	11	158
1995.3-8	Aengang Bay	35	124
	Keoge island	21	127
	ChoongMoo	11	120
	KwangYang Bay	47	134
	Pacific Deep sea	85	132
1995.9	Baek-do area	207	568
1995.10	Baek-do (solanderia secunda)		320
1995.10	Sari	130	167
1995.10	East sea sediment	157	58
	ChoomoonJin		210
1995.10	Southeast sea sediment	96	121
	YouSoo Bay		145
1995.12	TongYoung	173	88
1996.2	CheJoo island	171	277
	Suguipo		127
1996.4.	Eastsea dumping site	137	35
1996.6.	DaeBoo island	162	156
1996.9.	Eastsea dumping site	84	35
1996.10.	Asan Bay	11	59
	SapKyo	32	38
1996.12.	Yellow Sea	116	157
Total strains		2027	5023

Table 5-2. Screening results for novel enzymes and antibiotic activities.

유용활성	세균	방선균	고역가 균주	비고
Phospholipase A	236	252	12	1 종 정제완료 2 종 정제중
lipase	319		24	
SOD	270		5	2 종 정제 완료
Haloperoxidase		2	1	정제중
Agarse	7		2	
antibacterial activity	8	120	8	
antifungal activity	5	474	5	2 종 분리정제중

적인 측면에서 그 중요성이 크다. 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 지방산의 생산 방법은 Colgate Emery Method라 불리우는 화학적 가수분해법으로 많은 에너지를 필요로 할 뿐아니라 원치않는 부산물의 생산이 문제가 되고 있다. 이를 대체할 수 있는 방법으로 대두되고 있는 것이 지방가수분해 효소인 lipase를 이용하여 지방으로부터 지방산을 생산하는 방법인데 유용한 lipase의 원천으로서 미생물의 중요성이 강조되고 있다. 나아가서는 lipase를 분리 정제하여 사용하는 것보다 lipase를 생산하는 미생물 그 자체를 biocatalyst로 사용하여 지방으로부터 효율적으로 지방산을 생산하는 방식이 연구되고 있다.

특히 유기용매에 견딜수 있는 균주를 이용하여 유기용매:수용액의 2-phase 구조하에서 균주를 배양하는 것은 lipase반응후 형성되는 산물인 지방산과 glycerol을 각각 유기용매층과 수용액층으로 흡수시켜 원하는 산물인 지방산의 회수를 용이하게하고 아울러 균체가 존재하는 수용액층으로 녹아들어간 glycerol은 균체의 영양물질로 흡수되어 균체의 적정성장 및 활성도 유지에 도움을 주므로 대단히 유용한 반응체계이다. 현재 분리된 대부분의 lipase생산 균주는 isooctane, toluene등 유기용매하 (up to 20 %)에서도 성장 가능하므로 이러한 유기용매:수용액의 2-phase 구조하에서 일반 지방으로부터 지방산의 생산에 유용하게 사용될수있다. 분리된 각균주에 대한 최적 성장 및 지방산의 최적 생산 조건에 대한 연구가 수행되고 있다.

Strain #161의 경우 PL-plate에 의한 prescreening (Fig. 5-1)과 GC analysis (Fig. 5-2)를 거쳐 PLA₁ 생산 균주로 확인 되었으며 culture broth에 의해서 기질인 PLPC로부터 유리되는 fatty acid는 sn-1 과 sn-2 위치의 지방산이 모두 검출되었으나 sn-1 위치의 지방산이 sn-2 지방산 보다 약간 (20 %) 많이 검출되었다. 여기서 phospholipase A₁의 가능성과 함께 일반 lipase가 포함되어 있을 가능성이 고려되었다. 그러나 효소반응시간을 20 분이하로 줄일 경우 sn-1 지방산의 생산이 4 배에 달해 시간의 흐름에 따라 sn-2 위치의 지방산의 이동이 일어나는 것으로 사료된다.

본 균주의 배양액에 포함되어있는 extracellular phospholipase는 0.2 um membrane으로 cell을 제거한 뒤 다시 ultrafiltration (MWCO; 30 kD)에 의한 농축, DG-10 desalting column에 의한 buffer 교환과 High-Q anion exchange coumn chromatography 그리고 Sephadex G-200 gel filtration에 의한 정제 과정을 통하여 수율 12.8 %, purification fold 12배로 정제하였다 (Table 5-2). Extracellular enzyme의 경우 cellular enzyme에 비하여 그 함량이 낮고 특히 시간이 많이 소요되는 농축과정에서 손실이 크므로 정제도에 비하여 수율이 낮게 나타났다. 그러나 extracellular enzyme은 단일 종류의 균주를 배양하였을 경우 그 종류가 많지 않으므로 정제 및 대량 배양이 손쉬운 장점이 있다. 실제로 본 효소의 경우 전체 extracellular enzyme 중 본 phospholipase A의 함량은 거의 30 % 이상이 되는 것으로 사료된다.

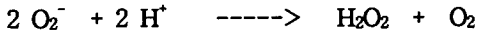
Table 5-3. Purification of PLA₁ produced by B161 strain.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
culture broth	3270	140	23.4	100	1
Ultrafiltration (PM30)	2455	67.5	36.4	75.1	1.6
IEX (High-Q)	1450	12.7	114.2	44.3	4.9
Gel filtration (Sephadex G-200)	420	1.5	280.0	12.8	12.0

5. 3. 2. Superoxide dismutase

Superoxide radical anion (O_2^-)은 분자 산소의 환원 과정에서 발생하는 중간 물질로 생체 내에서 산화제나 환원제의 역할을 하기도하며 그 결과 반응성이 큰 독성 물질을 생산하기도한다. 산소호흡을 하는 모든 생명체는 필연적으로 대사과정에서 생성되는 일련의 활성 산소 물질들에 의한 무차별 산화의 위험을 갖고 있다. 이들은 산화연쇄반응 (oxidation chain reaction)의 initiator일 뿐만 아니라 자체가 갖고있는 고유의 고반응성으로 생체내 분자들과 무작위로 반응하여 여러종류의 암발생의 원인이 될 뿐아니라 최근들어 관심이 고조되고 있는 노화의 가장 큰 원인이 되고 있다. 이에 대한 방어 기작으로 생명체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase 등의 항산화 효소들이 존재하여 이러한 활성산소 물질을 제거하는 기능이 있다. Superoxide dismutase (SOD)는 분자 산소가 1 개의 전자를 받아 환원된 superoxide anion (O_2^-)를 제거하는 반응을 수행하는 효소로서 산소 호흡으로 생명을 유지하는

생물들의 생체내에서 필연적으로 발생하는 active oxygen radical 들을 제거하는 생체 방어 체계의 일종이다 (Oyazagui, 1980). 즉 아래와 같이 2 분자의 superoxide anion을 산소와 과산화수소로 전환 (dismutation)시켜 superoxide anion의 독성을 감소시키는 작용을 한다.



본 효소는 active site에 존재하는 산화 환원 금속의 종류에 따라 Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/ZN-SOD 등 3 종류로 분류되며 세균의 경우에는 대개 Mn-SOD 나 Fe-SOD를 갖고 있으나 예외적으로 Cu/ZN-SOD를 갖고 있는 경우도 보고되고 있다. Cu/ZN-SOD는 주로 진핵생물에서 발견되고 있어 이경우는 양자간의 공생관계를 연구하는데 중요한 실마리를 제공해 주고 있다. 본효소의 유용성은 Streptococcus lactis와 같은 경우 실제로 유제품의 생산에 이용되는 인체에 무해한 미생물인데 이들은 Mn-SOD를 생산하므로 유제품의 산패 방지 및 기능성 강화라는 측면에서 산업계의 관심을 끌고있으며 SOD의 지방 산화 (산패)를 억제하는 기능을 이용한 천연 항산화제 (antioxidant)로서의 응용가능성은 1975 년 Michelson등에 의해 특허를 통하여 제시된 뒤 노화방지, 건강기능성 신소재, 국소빈혈, 동맥경화, 암, 당뇨병등의 의료용 치료수단으로서도 주목을 받고 있다. 이외에도 자유산소 라디칼등에 의하여 야기되는 통증의 치료등 소염 진통제나 피부보호를 위한 화장품 첨가제로 그 이용범위가 넓어 이를 해양 미생물로부터 분리 정제하여 그 특성을 조사하고 새로운 건강기능성 신소재로서 개발하기 위한 기본 자료를 마련한다.

5. 3. 2. 1. Selection of Strains

총탐색균주 1,200 주중 탐색결과 #348 균주와 #446 균주가 가장 높은 활성을 보여 이들을 효소 분리 정제 대상으로 선정하였다. Crude extract 상태에서 이들은 각각 3.1 unit과 3.3 unit의 높은 SOD 활성을 나타내었다.

5. 3. 2. 2. Selection of Media

최적 배지 선정을 위하여 ZoBell, Sea water complete, 75 % sea water LB 배지등을 사용하여 성장과 단위 균체당 SOD 활성을 검사한 growth curve를 구한 결과 Sea water complete가 가장 우수한 배지로 밝혀져 이를 주 배양 배지로 사용하였다 (Fig. 5-3). 이와 동시에 본 SOD는 cell mass에 따라 그 함량이 비례하여 증가하는 양상을 보였으며 stationary phase에 도달하면 급속히 활성이 낮아지는 현상을 보였다. 이에 따라 효소생산을 위한 균주회수의 시기는 초기 stationary phase에서 수행하였다.

5. 3. 2. 3. Optimal condition for Cell Mass

SOD는 활성 산소 radical을 제거하는 제독 효소이므로 본 균주의 단위 균체당의 SOD함량을 증대시킬 목적으로 여러 가지 산소 (공기) 분압 조건하에서 배양하여 균체당 SOD의 함량을 비교하였다. 그결과 산소분압이 높은 조건에서 SOD의 함량이 증가하였다 (Fig. 5-4)

5. 3. 2. 4. 해양세균 B348로부터 SOD의 정제

B348 균주로부터 SOD를 분리 정제하였다. 본 분리 정제는 농심(주)의 도움으로 당 연구소가 보유하고 있는 Biologic Protein purification system (BioRad, USA, FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography)를 사용하여 분리를 수행하였으며 이 과정에서 본 연구에서 수립된 SOD의 분석 방법을 전수하였다.

균체를 2.5 liter jar fermentor를 이용하여 SWC 배지에서 배양한 결과 배양 20 시간에서 최대의 효소활성도를 보였으며 이 때의 활성은 12.5 Unit/ml, 그리고 건조 균체량은 4.27 g/liter였다 (Fig. 5-5). 이 균체를 centrifugation으로 회수하여 ultrasonicator로 분쇄하여 얻은 조효소액으로부터 35-75 % ammonium sulfate precipitation, Bio-Scal Q ion exchange chromatography (Fig. 5-6), Superose 12HR gel filtration chromatography (Fig. 5-7), Mono-P cation exchange chromatography (Fig. 5-8), 2 차 Superose 12HR gel filtration chromatography (Fig. 5-9)를 이용하여 수율 0.9 %, 정제도 230.4 배의 정제된 SOD를 얻었다.

정제된 SOD의 전기영동결과 38.0 kD과 22.4 kD에서 2 개의 band를 확인할 수 있었으며 (Fig. 5-10) 이를 다시 HPLC를 이용한 gel filtration chromatography를 수행한 결과 112 kD에서 단일 protein peak가 나타나는 것으로 보아 본 SOD는 38.0 kD과 22.4 kD의 분자량을 갖는 4 개의 subunit으로 구성된 tetramer로 추정되었다 (Fig. 5-11). 정제과정과 각 과정별 정제도는 Table 5-4에서 명시하였다.

5. 3. 2. 5. 해양세균 B446으로부터 SOD의 정제

균체를 SWC 배지에서 배양한 결과 배양 20 시간에서 최대의 효소활성도를 보였으며 이 때의 활성은 12.5 Unit/ml, 그리고 건조 균체량은 4.27 g/liter였다 (Fig. 5-10). 이 균체를 centrifugation으로 회수하여 ultrasonicator로 분쇄하여 얻은 조효소액으로부터 35-75 % ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-25 ion exchange chromatography, Sephadex G-200 gel filtration chromatography, High-Q anion exchange chromatography를 이용하여 수율 7.6 %, 정제도 91.6 배의 정제된 SOD를 얻었다 (Table 5-5).

정제된 SOD의 전기영동결과 43 kD과 30 kD에서 2 개의 band를 확인할 수 있었으며 이를 다시 HPLC를 이용한 gel filtration chromatography를 수행한 결과 75 kD에서 단일 protein peak가 나타나는 것으로 보아 본 SOD는 43 kD과 30 kD의 분자량을 갖는 2 개의 subunit으로 구성된

heterodimer로 추정되었다.

Table 5-4. Purification of SOD produced by B348 strain.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
cell extract	10320	73.5	136.4	100	1
75 % ammonium sulfate ppt	6569.2	42.3	155.3	63.7	1.1
1st IEX (Bio-Scale Q)	3199.4	1.7	1932	31	14.2
1st Gel filtration (Superose 12HR)	1491.5	0.34	4386.9	14.5	32.2
2nd IEX (Mono P)	560.3	0.05	11200	5.4	82.1
2nd Gel filtration (Superose 12HR)	90	0.003	31433.3	0.9	230.4

Table 5-5. Purification of SOD produced by Marine bacterium B446.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell lysis	1235	2262	18.3	100	1
35-75 % ammonium sulfate ppt	996.4	1034	48.7	45.7	2.7
DEAE-Sephadex	234	480	205	21.2	11.2
Sephadex G-200	43.2	252	583	11.1	31.9
High-Q	10.2	171	1676	7.6	91.6

AS ppt: Ammonium sulfate (35 - 75 %) precipitation and desalting.

IEX: Ion Exchange column chromatography (High Q 등)

GF: Gel filtration (Sephadex G-100 등)

Specific activity: Activity/ $A_{280\text{ nm}}$

Total protein = Total volume X $A_{280\text{ nm}}$

$A_{280\text{ nm}} = 1$ about 1 mg/ml protein

Total activity = Total volume X activity of aliquot

5. 3. 2. 6. 해양세균 B446에서 분리된 SOD의 특성

가. Effects of some parameters on SOD activity

해양세균 B446에서 분리된 SOD의 특성을 알기위하여 배양온도 및 pH에 의한 활성도에 대한 영향 (Table 5-6, 5-7), 배양온도 및 pH 조건에서의 안정성 (Table 5-8, 5-9), 금속 ion의 영향 (Table 5-10), 금속 ion chealator인 EDTA의 영향 (Table 5-11), 그리고 산소대사에 영향을 미치는 NaN_3 , H_2O_2 , NaF , NaCN 등의 영향등 (Table 5-12)을 고찰하였다. 본 효소는 35°C , pH 8에서 최적 활성을 보였고 열에대한 안정성은 비교적 낮아 35°C 에서는 24 시간후 거의 모든 활성이 사라짐을 볼수있었다. 또 pH에대한 안정성은 pH 8에서 최적나타났다. 금속이온의 영향에서 Fe(II)와 Mg(II)의 경우 효소의 활성을 증가시키는 경향을 보였으며 이경향는 Fe(II)의 겨우 매우 뚜렷하게 나타나 Fe-SOD로 추정되었다. 그러나 Mn(II)나 Cu(II)는 효소의 반응을 1 mM 농도에서도 거의 완전히 저해하는 결과를 보였다. 금속 이온의 chealator인 EDTA의 경우는 낮은 농도에서는 chealation 효과보다 전자공여체로서의 역할이 커서 10 mM까지는 저해 현상 대신 약간의 증진효과를 보였으나 50 mM이상의 농도에서는 저해현상을 보였다. NaN_3 는 매우 강력한 저해효과를 보였으며 H_2O_2 와 NaCN 역시 10 mM에서 효소활성도를 50 % 감소시켰다. 그러나 NaF 에 의해서는 오히려 효소활성이 증가하는 결과가 나타났다. Mn-SOD의 inducer로 알려져있는 methyl viologen의 영향은 미미하였고 오히려 10 mM에서는 cell growth의 저해현상이 크게 나타났다 (Table 5-13).

Table 5-6. Effect of temperature on the SOD Activity.

Temperature	$[\text{A}_{530 \text{ nm}}]^{-1}$ SOD activity
15 °C	3.3
25 °C	4.7
35 °C	5.53
45 °C	4.27

Table 5-7. Effect of pH (pH 4 - 10) on the SOD Activity.

	SOD activity [$A_{530 \text{ nm}}$] ⁻¹		
	20 ul	50 ul	100 ul (SOD)
pH 4 and pH 5 : Acetate buffer (50 mM)			
pH 6 and pH 7 : Phosphate buffer (50 mM)			
pH 8 and pH 9 : TrisHCl buffer (50 mM)			
pH 10 : Carbonate buffer (50 mM)			
pH 4	0.81	1.45	1.73
pH 5	1.48	1.5	2
pH 6	1.61	2.4	2.5
pH 7	1.32	1.68	2.3
pH 8	2.49	2.68	4.2
pH 9	2.48	2.03	3.05
pH 10	1.02	1.05	1.43

Table 5-8. Effect of temperature on the SOD stability.

incubation of 0.1 ml SOD in 1 ml of 50 mM Tris.HCl (pH 8.0) at various temperatures for 24 hrs. and then assay in standard condition.

Remaining Activity of SOD after 24 hr	
	[$A_{530 \text{ nm}}$] ⁻¹
4 °C	6
15 °C	2.2
25 °C	1.3
35 °C	0.3
45 °C	0

Table 5-9. Effect of pH (pH 4 - 10) on the SOD Stability.

Incubation of enzyme in buffers of various pH for 24 hrs. and then exchange the buffer to 50 mM TrisHCl (pH 8.0) and assay in standard condition.

Remaining SOD activity after 24 hrs	
pH	$[A_{530 \text{ nm}}]^{-1}$
pH 4	0.93
pH 5	0.74
pH 6	0.4
pH 7	0.12
pH 8	0.58
pH 9	0.4
pH 10	0.23

Table 5-10. Effect of some divalent Metal ion on the activity of SOD.

	$[A_{530 \text{ nm}}]^{-1}$		
	1 mM	10 mM	50 mM
FeSO ₄ ,	2.7	4	12.5
MgCl ₂ ,	3	3.23	3.79
MnCl ₂ ,		no reaction	
CuCl ₂		no reaction	

Table 5-11. Effect of EDTA on the activity of SOD.

	$[A_{530 \text{ nm}}]^{-1}$		
	1 mM	10 mM	50 mM
EDTA	3.84	4.17	5.16

Table 5-12. Effect of potential inhibitors on the activity of SOD.

	$[A_{530 \text{ nm}}]^{-1}$		
	1 mM	10 mM	50 mM
KCN	4.5	3.57	3
NaF	4.2	5.3	4.5
H ₂ O ₂	3.7	2	0.27
	NaN ₃	no reaction	

Table 5-13. Effect of SOD inducer, Methyl viologen.

Methyl viologen	$[A_{530\text{nm}}]^{-1}/A_{660 \text{ nm}}$	$A_{660 \text{ nm}}$
0	3.2	1.7
1	3.1	1.6
10	3.2	1.4

After measure $A_{660\text{nm}}$, harvest cell from 10 ml of media, sonicate the cell paste with lysis buffer, centrifuge to remove cell debris and measure the activity.

5. 4. 실험방법

5. 4. 1. 균주 분리 및 보존

균주분리를 위한 해양생물 시료는 SCUBA로 채집된 즉시 2-3 g 정도의 시료를 취하여 외부에 묻은 물기를 제거하고 멸균된 가위를 이용하여 최대길이 0.5 cm 이하로 잘게 자른 뒤 1 ml의 멸균된 해수를 가하고 막자사발로 갈았다. 이를 미리 준비된 평판 배지에 0.1 ml 씩 가하고 도말하여 균체 집락이 형성될 때까지 배양하였다. 해저 퇴적물이나 해수는 멸균된 50 ml conical tube에 담아 실험실로 운반하여 처리하였다.

균주분리에 사용된 배지

1. Bennet ' s

2 g Glucose
2 g peptone
1 g Malto extract
1 g Yeast extract
Agar 20 g/liter
Aged sea Water
PH 7.2

2. Starch Casein KNO₃

18 g starch
10 g KNO₃
2 g K₂HPO₄
2 g NaCl
0.3 g casein
0.05 g MgSO₄·7H₂O
0.02 g CaCO₃
0.01 g FeSO₄·7H₂O
Agar 18 g/liter
Aged sea Water 70% (PH 7.0)

3. Chtin

4 g chitin
0.7 g K₂HPO₄
0.5 g MgSO₄·7H₂O
0.3 g KH₂PO₄
0.01 g FeSO₄·7H₂O
1 mg MnCl₂·4H²O
0.1 mg ZnSO₄·7H₂O
Agar 20 g/liter
Aged sea Water 70% (PH 8.0)

4. M3-I

0.732 g Na_2HPO_4

0.466 g KH_2PO_4

0.29 g NaCl

0.2 g Sodium propionate

0.1 g MgSO_4

0.02 g CaCO_3

0.01 g KNO_3

0.2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.18 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.02 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Cycloheximide solution 10ml/liter

Thiamin.HCl solution 10ml/liter

Agar 18 g/liter

Aged sea water 70 % (PH 7.0)

5. M3- II

0.732 g Na_2HPO_4

0.466 g KH_2PO_4

0.29 g NaCl

0.1 g KNO_3

0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.02 g CaCO_3

0.1 g Sodium propionate

4.0 mg Thiamine.HCl

0.2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.18 mg ZnSO_4

0.02 mg MnSO_4

Cycloheximide solution 10ml/liter

Thiamine.HCl solution 10ml/liter

Agar 18 g/liter

Aged sea water 70% (PH 7.0)

6. ZoBell 배지;

5 g peptone,
1 g yeast extract,
Agar 15 g/liter
Aged Sea Water 50 % (pH 7.0).

7. Sea Water Complete media

5 g Bacto triptone,
3 g Yeast extract
3 ml Glycerol
Agar 15 g/liter
Aged Sea Water 75 % (pH 7.0)

형성된 균체 집락들을 육안으로 그 집락 형태를 관찰하여 특성에 따라 새로운 고형 배지에 접종하여 동일 형태의 순수 집락을 형성하도록 세균의 경우 2 일간 25 °C 에서 그리고 방선균의 경우 7 일간 35 °C에서 배양한 후 순수 분리를 하였다.

분리장소는 거문도, 삼부도, 백도, 거제도, 남해도등 남해 일원을 중심으로 동해안과 서해안을 포함하고 아울러 태평양 심해저 시료와 남극 세종기기 근처 해역의 시료를 대상으로 해양세균과 방선균을 중심으로 수집하였으며 분리된 균주는 glycerol을 20 % 함유한 멸균 해수에 현탁하여 영하 70 도에 보관하였다.

5. 4. 2. Phospholipase A

5. 4. 2. 1. Phospholipase A 생산 검색

가. Screening with plate containing phospholipid

Phospholipase A 생산 검색은 Phospholipase A 중에서도 경제적 가치가 높은 Phospholipase A₂의 생산 검색에 주안점을 두었으며 이외에도 Phospholipase A₁ 및 Phospholipase C의 생산 여부도 함께 확인하였다. Soybean lechitine (Phosphatidyl choline)을 함유한 평판 배지에서 clear zone (Halo)을 형성하는 균주를 중심으로 검색하였으며 여타의 방법은 일반 lipase생산 검색과 동일하다.

배지조성:

(A) 1 g Yeast extract, 1 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
15 g Agar per 0.5 liter of Aged Sea Water

(B) 100 mM CaCl_2 solution in 0.5 liter Distilled water

(A), (B)를 121 °C 에서 각각 autoclave 한후 50 °C 정도로 식힌후 10 g의 멸균된 soybean lecithine (Sigma Co., 60 % phosphatidyl choline 함유)과 5 g의 Taurocholic acid를 가하고 magnetic stirrer로 상온에서 격렬하게 저어 섞어 준 다음 plate에 각각 20 ml정도씩 분주하여 사용하였다.

균주 접종은 멸균된 이쑤시개를 이용하여 각 plate 당 약 50 균주를 spot 형태로 접종하고 24 시간 배양후 halo의 형성 형태와 크기를 육안으로 확인하는 한편 calipus를 이용하여 형성된 halo의 크기를 측정하였다.

나. 해양발광 세균 *Vibrio harveyi* M-17을 이용한 Bioluminescence assay

Phospholipase A 활성도 측정에는 주로 사용되는 방법이 방사성 동위 원소로 표식된 지방산을 갖는 인지질 (주로 phosphatidyl choline 또는 phosphatidyl ethanolamine)을 기질로 사용하여 이로부터 본 효소의 반응 결과 유리된 방사성 동위 원소로 표식된 자유지방산을 박막 크로마토그래피등의 방법으로 기질과 분리하여 liquid scintillation counter를 이용하여 정량하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있으며 이외에 유리되는 지방산에 의하여 반응액의 pH가 낮아지는 것을 이용하여 검출하는 pH-Stat 방식등이 사용되고 있다. 그러나 pH-stat의 경우 그 민감도가 그리 높지 않고 방사성 동위 원소 사용법은 환경오염등의 이유로 그 사용에 많은 규제가 따르고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 새로이 해양발광 세균을 이용한 Phospholipase A₁ 활성도 분석법을 개발하였다. 이 방법은 해양에 서식하는 발광 세균을 이용하는 것으로 사용된 균주는 발광 세균 *Vibrio harveyi*를 nitrosoguanidine으로 돌연변이를 유도 시켜 얻어진 돌연변이 균주 M-17 을 사용하였다. 본균주는 항상 빛을 내는 wild-type과는 달리 빛을 내지 않으나 긴사슬을 갖는 알데히드 (decanal 또는 tetradecanal)나 지방산중의 myristic acid (14:0)를 첨가하였을 경우 wild-type 수준의 밝은 빛을 내는 특징을 지니고 있다. 따라서 sn-1 위치에 myristic acid를 갖고 있는 phosphatidyl choline (sn-1 myristoyl sn-2 stearoyl phosphatidyl choline, MSPC, Sigma Chemical co., USA)을 기질로 사용하면 반응 결과 유리된 myristic acid에 의하여 발광 반응이 유도 되며 방출되는 빛의 양은 유리된 myristic acid의 양에 비례한다. 우선 myristic acid의 농도에 따른 빛의 세기를 본 standard curve를 구하였다 (1 차년도 보고서 참조). 약 5 nM부터 10 uM까지의 myristic acid에서 직선 의존도를 보였으며 이보다 높은 농도에서는 포화 현상이 관찰

되었다. 반응이 종료된 후 이로부터 시료내에 함유된 유리 myristic acid의 양을 정량할수 있으며 이에 따라 효소의 활성도를 계산할수있다.

다. Gas chromatographic assay of Phospholipase A

Phospholipase activity assay 조건

Phospholipase의 활성 검사는 sn-1 palmytoyl sn-2 linoleoyl phosphatidyl choline (PLPC, Sigma chemical co.)을 기질로 사용하였다. Chloroform에 기질을 100 mg/ml로 녹인 뒤 동량의 5 % NaCl로 2 차례 추출하여 구입과정중 기질의 분해로 형성된 소량 함유되어 있는 유리 지방산 (palmitic acid와 linoleic acid)을 제거하고 0.5 ml eppendorf tube에 10 ul씩 분주하여 speed-vac 으로 solvent를 제거하고 -20 °C에서 보관하여 사용하였다. Solvent로 MeOH를 사용할 경우 enzyme에 의한 transmethylation 반응에 의해 다량의 Fatty acid methyl ester가 형성 되므로 주의해야 한다. 이 경우 bioluminescence reaction에 의한 분석이나 GC에 의한 분석에서 false 나후 미을 줄 수있다. 효소액 (cell을 키운 broth 또는 정제 과정의 시료) 0.1 ml를 PLPC가 들어있는 0.5 ml eppendorf tube에 가하고 각 10 ul씩의 1 M TrisHCl buffer (pH 8.0), 0.5 M CaCl₂, 80 mM sodium deoxycholate를 가한 후 vortex로 혼합한 뒤 dry thermal block (Thermolyne Co., USA)를 사용하여 37 °C에서 20 분간 반응시켰다. 반응후 0.2 ml의 chloroform:MeOH = 1:1 solution으로 반응액을 추출하고 1 분간 centrifuge하여 층을 분리한 후 추출액을 농축하지 않고 1 ul 따서 GC (HP5890II plus)로 분석하였다. 사용된 column등 분석조건은 아래와 같다.

사용 column : HP-1 (0.53 mm X 2.5 meter), 10 meter 짜리 column을 구입하여 4 등분하여 사용하였으며 경우에 따라서는 1 meter 길이로 제조하여 사용할 수도 있다. 본 column을 사용할 경우 그 짧은 길이로 해서 boiling point가 높은 fatty acid도 transmethylation 과정 없이 분석할 수 있다. 단 조성을 모르는 지방산 혼합물의 조성 분석용으로는 낮은 resolution 때문에 적합하지 않다.

Gas chromatography 분석 조건:

Injector Temperature	300 °C	Injector A (split)
Detector Temperature	300 °C	Detector B (FID)
Oven Temperature	150 °C - 180 °C	Gradient
Initial Temp.	150 °C	
Initial time	1 min.	
Final Temp.	180 °C	
Final time	1 min.	
Gradient rate	5 °C/Min.	

Purge OFF time	0 min.	Splitless mode
Purge ON time	0.1 min.	Split mode start
Total flow	25 ml/min.	
Column flow	5 ml/min.	
Split ratio	5	

라. Phospholipase A₁의 분리 정제

1. Extracellular protein의 농축

우선 culture broth를 75 %의 (NH₄)₂SO₄ precipitation 방법을 처음에 사용하였으나 효소의 활성도의 감소가 심해 대신 한외여과법 (Ultrafiltration)을 사용하였다. 2 liter의 배양액을 MWCO 50,000 filter (Minikross lab system, Microgon, USA)에서 일단 여과한후 여과액과 잔여액의 활성을 비교한 결과 양쪽모두에서 동일한 수준의 활성이 검출되어 본 효소는 분자량이 50,000 이하임을 추정할수 있었으며 여과액을 다시 MWCO 30,000의 filter (PM30, Amicon Co., USA)에서 농축한 결과 대부분의 (90 % 이상) 효소가 잔여액에 남아 있었다. 이 잔여액은 75 %의 sea water를 포함한 sea water complete 배지이므로 ion exchange chromatography를 수행하기 위하여 Bio-Rad DG-10 desalting column을 사용하여 buffer를 TrisHCl (50 mM, pH 8.0, 0.1 M NaCl)으로 교체하였다.

2. Ion exchange column chromatography

TrisHCl (50 mM, pH 8.0, 0.1 M NaCl)에 녹아있는 효소액을 High-Q anion exchange column (Bio-Rad Co., 5 ml bed volume)에 loading한후 이를 0.1 M부터 1 M의 NaCl을 함유한 TrisHCl (50 mM, pH 8.0) buffer로 elution 시켰다. Elution되는 protein은 UA-6 UV monitor (ISCO, USA, with 254 nm filter)로 검출하였으며 크게 3 개의 protein peak를 보였으며 0.5-0.7 M NaCl 농도에서 나오는 peak에서 phospholipase 활성이 검출되었다. 각 fraction의 활성 검색에는 PLPC 대신에 dimyristoyl PC를 기질로 사용하여 *V. harveyi* M-17 균주를 이용한 발광 반응으로 Camera luminometer를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 모든 column chromatography 과정의 fraction의 활성도를 측정하는데 사용되었으며 GC analysis에 비하여 시간과 노력을 크게 절약할수 있다.

3. Gel filtration chromatography

활성 분획을 모아 다시 MWCO 30,000 filter로 ultrafiltration하여 농축한후 이를 Sephadex G-200 column (2 X 95 cm)에 loading하여 TrisHCl (50 mM, pH 8.0, 0.1 M NaCl)로 elution하

였다 (flow rate = 12 ml/hr). Elution되는 protein은 UA-6 UV monitor (254 nm filter, ISCO, USA)로 검출하였으며 2 개의 protein peak를 보였으며 major peak에서 phospholipase 활성이 검출되었다.

4. Native gel electrophoresis

Novex precasted gel (8 %, 8 cm X 8 cm X 1 mm)을 사용하여 native gel electrophoresis를 수행하였다. 추정 분자량은 42,000 정도이며 soybean lechithine plate에서 halo를 형성하는 위치에서 효소의 존재를 확인하였다.

Native gel sample buffer (Tris-Glycine, 2 X)

1.5 M TrisHCl (pH 8.8)	4.0 ml
0.1 % Bromophenol blue	0.5 ml
Glycerol	2.0 ml
D.W.	to 10.0 ml

Native gel running buffer (10 X)

Tris base	29 g	(2.9 g)
Glycine	144 g	(14.4 g)
D.W.	to 1 liter	(to 100 ml)

1 X running buffer should be pH 8.3.

5. 4. 3. Superoxide dismutase

5. 4. 3. 1. Superoxide Dismutase 생산 균주 검색

가. Screening method

Agar plate 상에서 NBT-염색법

Agar plate당 10 개의 대상 균주를 작은 막대 형태로 배양한후 균체 집락이 형성되었을 때 Whatman #1 filter를 이용하여 제작된 replica로 균체를 찍어서 균체를 filterpaper로 옮기고 이를 0.5 ml의 lysozyme solution (1 mg/ml)을 흡수시켜 30분간 반응시켜 균체의 세포벽을 깬다. 다시 CHCl_3 증기로 포화된 desiccator에서 30 분간 방치하여 세포막을 분해한다. 필요에 따라 2-3회 얼렸다 녹이는 과정을 반복하여 세포내 물질을 유출시킨뒤 이 filter paper를 미리준비한 plate 내의 고형 buffer (50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1 % agar, pH 7.5)에 3 시간 올려 놓

아 효소등 세포내 물질들을 고형 buffer로 이동 시킨다. 여기에 반응 용액 (0.55 mM NBT, 66 uM riboflavin, 0.1 % TEMED, 50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1 % agar, pH 7.5)을 끓여 agar를 녹인뒤 55oC로 식힌후 15 ml씩을 각 탐색 대상 plate위에 붓는다. 상온, 암실에서 3 시간 동안 반응 시킨뒤 형광에 쬐어 발색 반응을 유도한다. NBT와 superoxide anion 간의 반응에 의해 짙은 푸른색의 monoformazan이 형성되고 SOD activity를 갖고 있는 균체의 위치에서는 이러한 발색이 유도되지 않아 반투명한 반점으로 나타나게 된다. 이러한 방법으로 plate로부터 1 차 screening한 후 선택된 균주들을 대상으로 2 차 확인에 들어간다.

나. 효소활성도 측정법

반응용액의 제조

Solution I : 10 uM of FMN (5 mM stock solution에서 즉시 만들어 씁니다)
5 mM Hydroxyl amine (NH₂OH) (1 M solution에서)
in 25 mM TrisHCl buffer (pH 8.0, 1 mM EDTA).

Solution II: sulfanilic acid 용액 (20 mM)

1.7 g of sulfanilic acid in 375 ml의 더운 증류수에 녹인뒤 상온으로 식혀 여기에 125 ml의 acetic acid를 가하여 부피를 500 ml로 맞춘다. Acetic acid의 농도는 4.2 M로 조정되었다.

Solution III : naphthyl amine 용액 (7 mM)

0.5 g의 naphthyl amine을 100 ml의 끓는 증류수에 녹인후 상온으로 식혀서 여기에 125 ml의 acetic acid를 가하고 다시 증류수로 500 ml로 부피를 맞춘다. Acetic acid의 농도는 4.2 M로 조정되었다. Naphthyl amine은 발암 물질로 추정되고 있으므로 사용에 각별한 주의를 기울여야한다.

Sea water complete-agar 배지에서 배양된 검색 대상 균주들을 loop로 끊어서 약 50 mg 정도의 균체를 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 -20 °C에서 2 회 얼리고 녹여 cell wall을 약화 시킨 후 여기에 lysis buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.0, 10 mM EDTA) 0.5 ml를 가하여 cold chamber (4 °C)에서 30분간 교반하여 osmotic lysis에 의하여 cell wall과 membrane을 파괴하고 원심분리 (12,000 rpm, 5 min, 한일 microcentrifuge H-12)하여 cell debris를 제거하고 효소가 녹아나온 상층액을 탐색 대상 효소원으로 사용하였다. 이 cell extract를 각각 0.1 ml를 취하여 96 well microplate의 각 well에 가하고 0.1 ml의 반응액 I을 가하여 형광등하에서 20 분간 반응 시킨후 반응액 II 와 III를 각각 0.1 ml씩 가하여 540 nm optic filter를 장착한microplate reader (BioRad co. model 3550)를 이용하여 흡광도를 측정하여 control과 비교하여 흡광도가 감소된 시

료를 탐색하였다.

효소활성은 Glass test tube (7.5 X 12)에 효소원 0.1 ml를 넣고 여기에 0.5 ml의 Solution I 을 가하여 잘 섞어준후 25 °C 에서 형광등으로 빛을 쬐어 25 분간 방치한다. 여기에 각각 1 ml 씩의 Solution II 와 Solution III 을 가하여 20 분후 spectrophotometer (Milton-Roy MR-3000, Baushroam Co., USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 조사한다. 흡광도가 낮을 수록 SOD 활성이 강함을 의미한다.

반응의 원리는 다음과 같다.

- (1) $FMN + EDTA + O_2 + \text{light} \rightarrow O_2^-$
- (2) $NH_2OH + O_2^- + H^+ \rightarrow NHOH + H_2O_2$
- (3) $NHOH + O_2^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$

반응(1)에서 FMN이 EDTA를 electron donor로 이용하여 photochemical reduction에 의해 FMN₂로 전환되고 다시 산소와 반응하여 FMNH-4a-hydroperoxide를 형성한 후 이 hydroperoxide의 분해에 의하여 superoxide radical이 형성된다. 이렇게 형성된 superoxide radical 이 hydroxyl amine과 반응하여 NHOH를 형성하는데 (반응 2) SOD는 superoxide radical을 quenching하여 이 과정을 저해하여 nitrite의 생산을 낮춘다. 이렇게 형성된 nitrites는 산성 조건에서 sulfanilic acid와 반응하여 diazo 화합물을 형성하고 이것이 다시 naphthyl amine과 반응하여 530 nm에서 최대 흡광치를 보이는 붉은색 화합물을 형성한다.

본 분석 조건에서 SOD 효소활성도의 단위는 본 assay 방법이 위의 반응(1)에서 photochemical reaction의 결과 형성된 superoxide anion이 NH₂OH와의 반응을 경쟁적으로 저해하는 활성이므로 Michaelis-Menten 식에서 competitive inhibition의 pattern에 따른 상관 관계를 보이므로

$$SOD \text{ activity} = [A_{530nm} (\text{sample})]^{-1} - [A_{530nm} (\text{control})]^{-1}$$

으로 결정하였고 이에 따르면 포함된 효소의 양과 activity가 가장 직선에 가까운 curve를 보인다 (Fig. 12).

다. SOD의 정제

1. Cell harvest

Late exponential phase에 도달한 균주를 0.2 um pore size의 tangential flow filter (3,500 cm² surface, Microgon Co., USA)를 이용하여 2 liter로 농축시키고 High speed centrifuge

(Vision Science Co., Korea)로 8,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 균체를 수확하였다.

2. Cell Lysis with sonication (1 min)

100 g 정도의 균체를 얻은후 여기에 미리 4 °C로 식혀둔 900ml의 lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 cold room에서 1 시간동안 교반 시킨다. 세포파괴를 보다 확실히 하기위하여 초음파분쇄기를 이용하여 얼음물에 담근 상태에서 1 분간 초음파를 가하고 1 분간 교반 시키는 과정을 5 회 반복한다. 세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기위하여 10,000 rpm 에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다.

3. (NH₄)₂SO₄ precipitation (35 % - 75 %) and Desalting.

Ammonium sulfate농도 35 %와 75 % 사이에 침전된 침전물을 회수하였다. 이를 20 ml의 50 mM TrisHCl buffer (pH 8.0)에 녹인후 DG-10 desalting column으로 ammonium sulfate를 제거하였다.

4. Ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-25)

이를 DEAE-Sephadex column (2.5 cm x 30 cm)에 가하고 column을 100 ml의 동일한 buffer로 씻어준다. 여기서 0.1 M에서 0.8 M까지 NaCl 농도구배를 형성하는 50 mM TrisHCl buffer (pH 8.0)로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 SOD활성도를 보이는 분액을 회수하여 Ultrafiltration (Amicon stirred cell, 50 ml capacity, with PM30 membrane filter)하여 5 ml로 농축하였다.

5. Gel filtration chromatography (Sephadex G-200)

이를 Sephadex G-200 column (2.5 cm x 95 cm)에 가하고 column을 0.1 M NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 용출시켰다 (Flow rate = 10-12 ml/hr) .

6. Second Ion exchange chromatography (High-Q cartridge)

활성 분획을 모아 Ultrafiltration (Amicon stirred cell, 50 ml capacity, with PM30 membrane filter)하여 5 ml로 농축하고 이를 High-Q cartridge (Bio-Rad Co., 5 ml capacity)에 가하고 0.1 M에서 0.8 M까지 NaCl 농도구배를 형성하는 50 mM TrisHCl buffer (pH 8.0)로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 SOD활성도를 보이는 분액을 회수하여 Ultrafiltration (Amicon stirred cell, 50 ml capacity, with PM30 membrane filter)하여 5 ml로 농축하였다. 이를 다시 Microcon ultrafiltration centrifugal filter (Centricon 30, Amicon Co., USA)로 50 ul로 농축하였다.

7. Native gel electrophoresis (dual staining)

Native gel electrophoresis의 조건은 PLA1과 동일하며 염색은 prescreening시 사용한 NBT staining method를 사용하여 SOD band를 확인하였다.

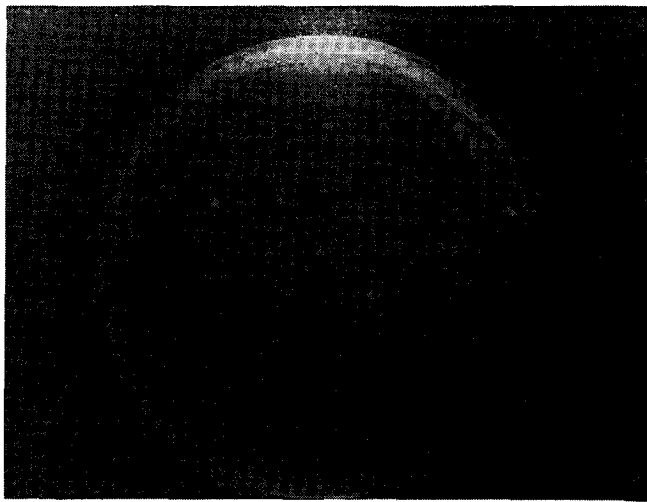


Fig. 5-1. Halo formation on PL-plate by B161.

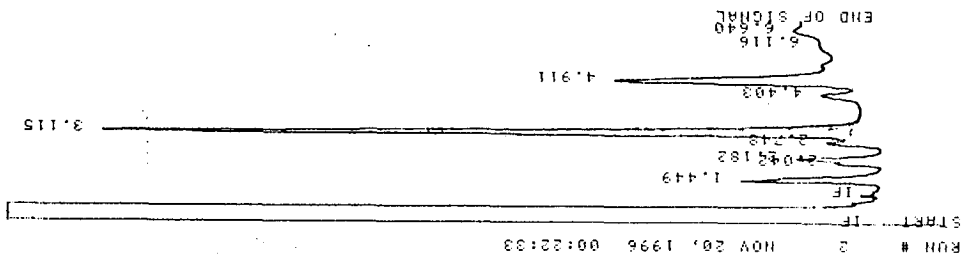


Fig. 5-2. GC analysis of fatty acids produced from HPLC by the culture broth of B161.

Growth Curves of B446 strain

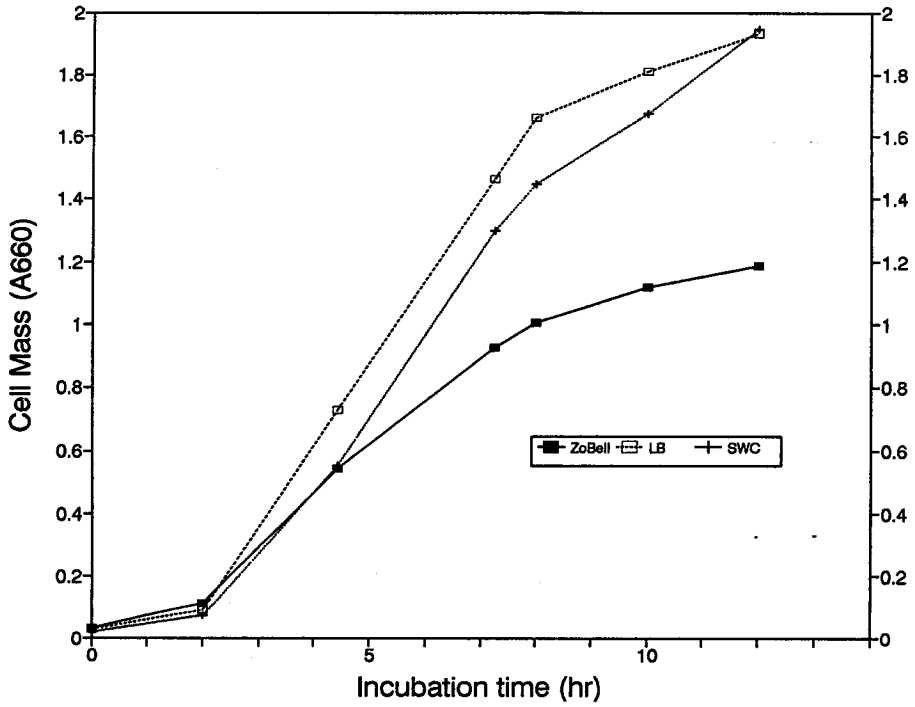


Fig. 5-3. Growth curve of B446 strain in LB, ZoBell, and SWC for the selection of media.

Effect of Oxygen tension

(A660nm, SOD on S/V)

1996. 7. 18

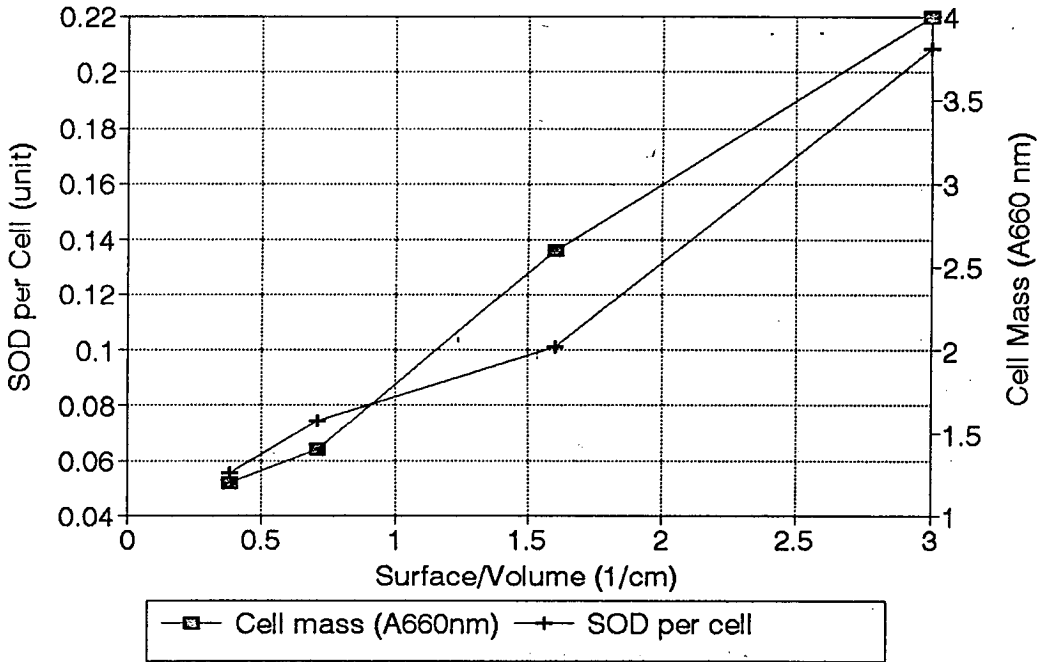


Fig. 5-4. Effects of oxygen tension for the growth and SOD activity of B446.

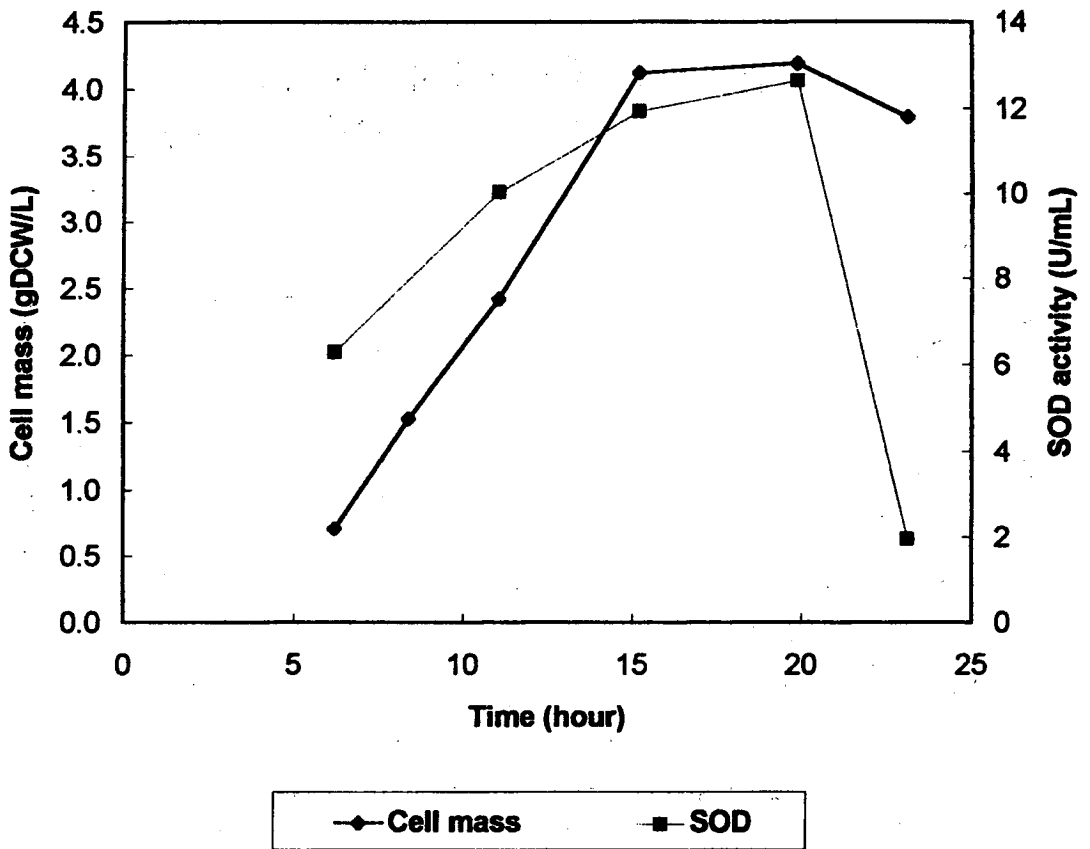


Fig. 5-5. The time course of cell mass and SOD activity in 2.0 liter jar fermentor using SWC media.

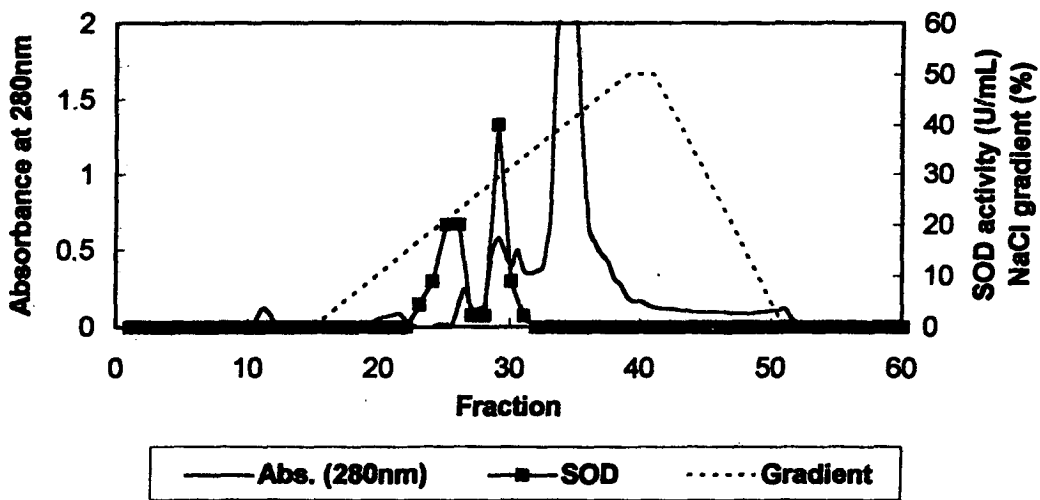


Fig. 5-6. Bio-Sal Q ion exchange chromatography of B348 SOD.

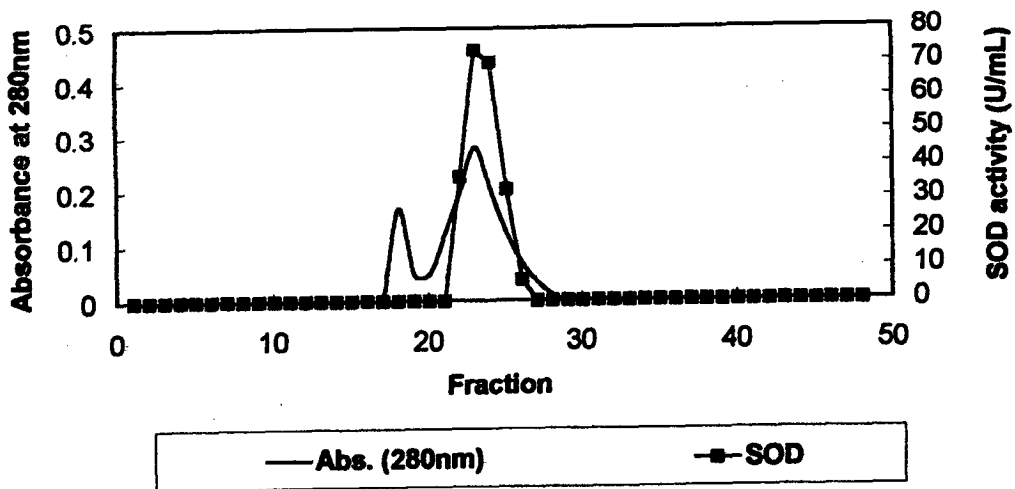


Fig. 5-7. Superose 12HR gel filtration chromatography of B348 SOD.

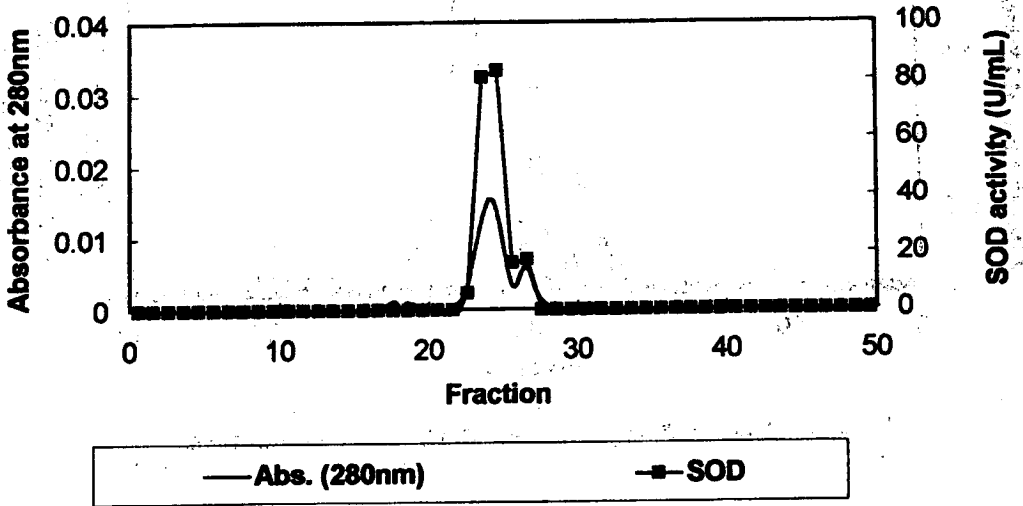


Fig. 5-8. Mono-P cation exchange chromatography of B348 SOD.

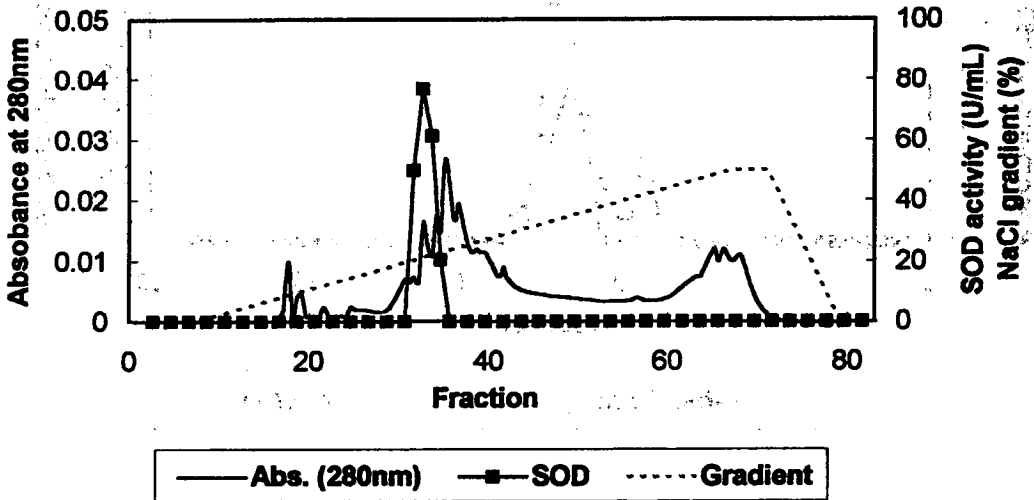


Fig. 5-9. Second Superose 12HR gel filtration chromatography of B348 SOD.

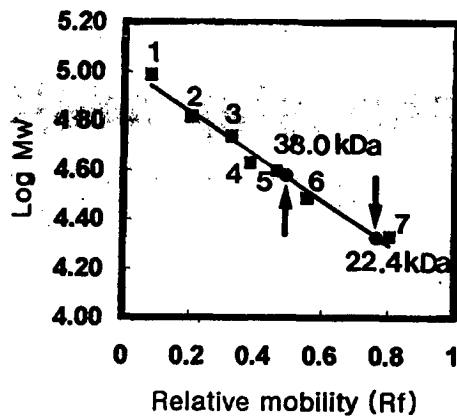


Fig. 5-10. SDS-PAGE of purified SOD and molecular weight determination showing 38.0 kD and 22.4 kD band.

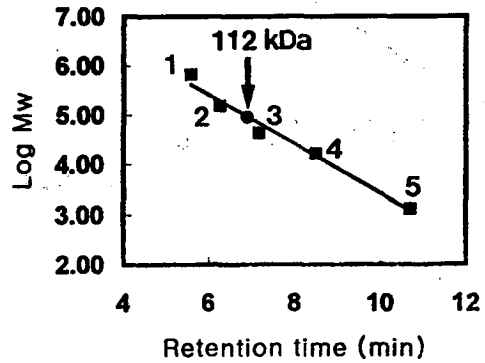
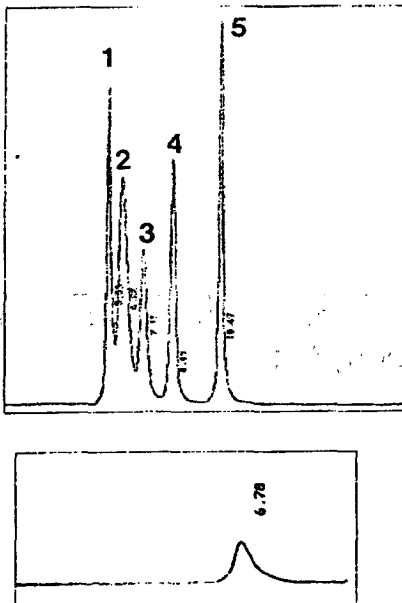


Fig. 5-11. Chromatogram of SOD by HPLC gel filtration chromatography.

Linear relationship of SOD assay

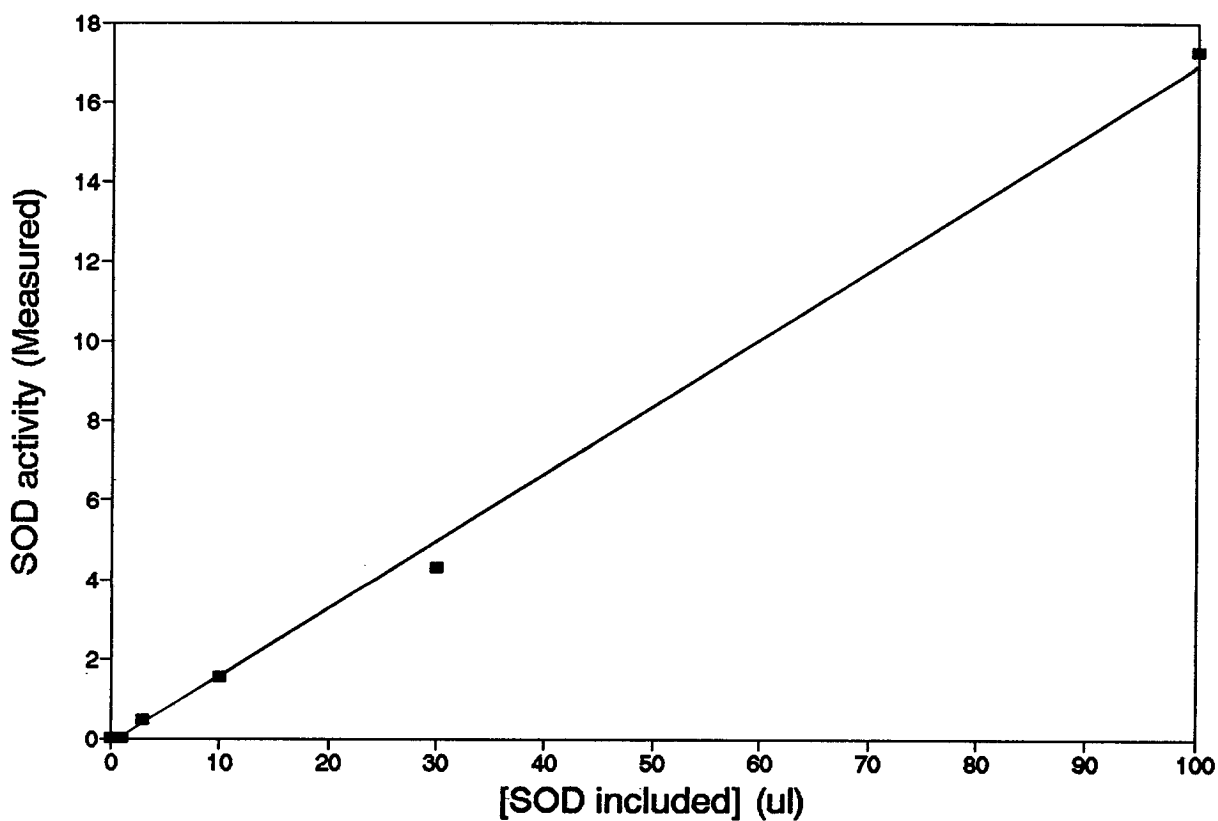


Fig. 5-12. Standard curve for Absorbance at 530 nm versus enzyme amount.

제 6 장 생리활성도 측정 체계구축

6. 1. 서론

생리활성도의 측정체계는 그 말 자체가 갖는 의미 만큼이나 다양한 내용을 포함하고 있으므로 대부분의 연구자들은 가능한 한 많은 수의 시료를 한 두 종류의 생리활성 검색에 걸 것인지 아니면 소량의 나뉠대로 선택된 시료를 가능한 한 많은 종류의 생리활성검색을 시도할 것인지 고민하게 된다. 현재 국내의 대부분의 연구자는 나뉠대로 한두 종류의 생리활성 검색 체계, 예를 들어 항암이나 특정종류의 효소저해 검색 체계등을 구축해 놓고 거의 맹목적으로 공급가능한 시료를 검색하거나 하고 있는 형편이다. 이 경우 구축된 생리활성 검색 체계가 완전히 독자적이거나 공급되는 검색 대상 시료들이 그전에 전혀 대상으로 한 적이 없는 새로운 시료일 경우 성공 가능성은 매우 높다. 일단 구축된 생리활성도 검사 체계를 단순 가동하는 일상적인 업무로서도 충분히 소기의 목적을 달성할 수 있기 때문이다. 그러나 생리활성 검색 체계가 이미 오래전에 구축되어 가동되고 있는 경우, 예를 들어 단순한 cancer cell line을 사용한 세포 독성의 측정등을 사용할 경우 이 방법은 앞서의 연구자들이 이미 발견한 물질을 다시 발견한다거나 심지어는 그들이 거쳐왔던 일련의 시행착오를 그대로 답습하는 결과를 초래하기 쉽다. 이 경우는 미국 NCI (National Cancer institute)등과 같이 다양한 종류의 검색 체계를 구축해 놓고 주어진 검색 대상 시료를 이 모든 검색 체계에 대상 시료로 처리하여 해당되는 활성을 찾아내는 소위 Total search의 방법을 사용하여야한다. 단 이 방법은 많은 비용과 인력이 소모되어 개개의 연구 그룹들이 쉽게 사용할 수 없다는 단점이 결정적으로 작용한다.

그러나 충분한 분리 정제 및 구조 결정능력이 구비된 연구 그룹의 경우 또 한가지 유력한 방법은 모든 생체 물질은 목적에 의하여 합성되었다는 (天不生 無命之草)충분히 타당한 가정하에 신규 구조의 가능성이 있는 물질의 탐색과 분리 정제 그리고 극히 일반적이고 비용 및 인력이 거의 필요하지 않은 기본 생리 활성의 검색체계를 병행하여 수행하고 이에 더불어 생체 대사에 중요한 특정 효소를 target으로 선정하여 이들에 대한 저해 효과를 탐색하는 target oriented screening도 함께 수행하는 것이 그 효과가 입증되고 있는 최근의 세계적인 추세이다. 본 연구도 이에 따라 NMR에 의한 구조결정을 Key로 하여 Brine shrimp lethality activity 및 antifungal activity를 일반 생리활성으로 구축하고 이에 더불어 phospholipase A₂ inhibition, DNA 및 RNA cleavage activity, Reverse transcriptase inhibition, antioxidant activity 등의 생리 활성 체계를 구축 가동하고 있다.

6. 2. 생리활성도 측정 체계구축

6. 2. 1. Reverse transcriptase inhibition

6. 2. 1. 1. 검색의 의미

HIV 등 RNA를 유전 물질로 갖고 있는 virus들은 여러 가지 형태의 질병의 원인으로 알려져 있다. 이러한 virus가 생체 내에서 번식하는데 필수 효소중의 하나인 역전사효소 (RT, reverse transcriptase)는 자신의 유전인자인 RNA를 원형으로 DNA를 합성하게 하는 효소로서 일단 형성된 DNA는 피감염 세포의 단백질 합성 체계를 이용하여 다량의 RNA와 protein을 합성하여 번식하게 된다. 본 효소는 virus의 생장에 필수효사이므로 이의 저해제를 개발하는 것은 antiviral agent 개발에 필수적이라고 할 수 있다. 또 본 효소는 retrovirus 이외에는 생장에 필수적이지 아니므로 본 효소의 저해제는 일반 세포들에 대한 독성이 적은 target orient된 물질이 될 수 있다. 본 효소저해제의 screening 방법은 주로 방사성 동위원소를 표지된 nucleotide triphosphate(주로 tritium으로 label된 TTP)를 기질로 사용하여 형성된 cDNA로 유입된 총 방사성 동위원소를 정량하는 방법이 흔히 사용되어 왔으나 결과의 부정확성과 환경 오염등 사용에 문제가 많아 본 연구에서는 이를 사용하지 않고 agarose gel electrophoresis상에서 cDNA와 RNA의 complex를 detection하는 방법을 사용하였다. 본 방법은 다량의 시료를 동시에 신속하게 검사하고 실험자에게 비교적 해가 적은 검사법이다.

(+) RNA를 template로 사용하여 reverse transcription을 수행하면 형성된 DNA single strand와 원래의 RNA는 duplex를 이루게 된다. 이 RNA:DNA duplex는 원래의 RNA의 분자량보다 거의 2 배가 되므로 반응 혼합물을 agarose gel에서 전기 영동하면 명확히 분리가 된다. 16S rRNA와 같은 secondary structure를 갖는 RNA를 기질로 사용하면 이것은 globular form으로 존재하므로 이동이 linear form보다 빨라 더 잘 분리된다. 단 반응온도를 16S rRNA의 secondary structure를 해체할 수 있을 정도로 높을 필요가 있다. 약 42 °C에서의 실험은 만족할 만한 결과를 보여주었다.

6. 2. 1. 2. 실험방법

(+) RNA를 template로 사용하여 cDNA를 합성하는 방법에 따라 수행하였다. 사용된 모든 buffer는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 후 autoclave하여 RNase를 제거하였으며 (+) RNA는 E. coli에서 분리 정제한 16S rRNA를 사용하였고 primer는 random primer나 3'-terminal에 상보적인 designed primer를 한국생공 (주)에서 주문하여 사용하였다. Electrophoresis는 MupidII kit를 사용하여 1.5 % agarose gel에서 TBE buffer (25 mM Tris:Borate:EDTA buffer, pH 8.0)로 수행하였으며 100 Volt에서 30 분간 전개하였다. RT inhibition의 positive control로는 aurin tricarboxylic acid를 사용하였다.

Nonisotopic Reverse Transcriptase (RT) assay.

stock solution	volume	final concentration
1. NTPs (10 mM ea)	2 ul	1 mM ea
2. Primer (0.5 mg/ml)	1 ul	0.5 ug
3. (+)RNA (0.5 mg/ml)	1 ul	0.5 ug
4. RT (MMLV) (100 U/ul)	1 ul	100 U
5. Reaction Buffer (5 X)	2 ul	1 X
6. MgCl ₂ (25 mM)	4 ul	5 mM
total volume		20 ul

Reaction buffer : 25 mM Tris: Borate: EDTA buffer (pH 8.0)

Designed primer: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC

6. 2. 2. Antioxidation activity

6. 2. 2. 1. 검색의 의미

최근들어 세포의 노화 및 발암의 원인으로 산소 호흡의 결과 필연적으로 발생하는 활성산소의 역할이 점차 밝혀지고 있는데 체내에는 이러한 유독성 활성 산소를 제거하는 효소들이 방어 기작으로서 존재하고 있다. 활성 산소로는 산소 분자에 1 개의 전자가 보태져서 생기는 supeoxide anion (O_2^-), 2 개의 전자가 보태어진 hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 transition metal 존재하에서 hydrogen peroxide의 분해에 의하여 생기는 hydroxyl radical (OH) 등이 있는데 이들중 supeoxide anion (O_2^-)은 가장 먼저 생성될 뿐아니라 생체내에서 수명도 비교적 길기 때문에 독성의 주요 이유가 되고 있다. 본연구에서는 이러한 supeoxide anion (O_2^-)의 제거에 관련된 superoxide dismutase를 해양 미생물에서 개발하고 있는데 이와 관련하여 비단백질로서 SOD와 같은 항산화 활성을 갖는 물질 (tocopherol, ascorbic acid, retinoic acid, etc.)의 개발이 노화방지를 위하여 필요하며 이를 위한 활성 검색법을 구축하였다.

6. 2. 3. DNA 및 RNA cleavage activity

6. 2. 3. 1. 검색의 의미

Doxorubicin이나 actinomycin, bleomycin 등의 항암제나 항생제는 암세포나 감염된 미생물들의 DNA에 결합하여 이를 파괴하거나 강한 부착으로 자연적으로 일어나는 손상의 수리나 polymerization을 방해하여 약효를 나타내는 것으로 알려져있다. 본 연구에서 천연물들이 나타내는 생리활성의 검색법으로 DNA cleavage assay를 가동하고 있으며 이와함께 최근에 발견된 ribosomal RNA에 대한 cleavage assay도 수립하였다. RNA cleavage activity는 단백질합성에 관여하는 rRNA를 파괴하여 정상적인 성장을 저해하고 세포의 사멸로 유도하는 것으로 여겨진다.

6. 2. 3. 2. 실험방법

DNA 시료로는 pUC119 supercoiled plasmid를 분리 정제하여 사용하였고 RNA 시료로는 E. coli 16S rRNA를 분리 정제하여 사용하였다. Plasmid의 분리 정제는 Sambrook등 (1992)의 alkaline lysis 방법을 사용하였고 relaxed form의 plasmid가 생성되지 않도록 제조하였다. Supercoiled plasmid의 경우 장기간 보관하면 일부가 relaxed form으로 쉽게 전환되므로 본 검색이 필요할 때 소량의 cell로부터 즉시 분리하여 사용하는 방법을 택하였다. 다량의 plasmid가 필요한 경우에는 Ion exchange chromatography (Jetstar plasmid purification kit, Genomid, USA)도 사용하였다. 이 경우 yield는 다소 낮지만 pUC119와 같은 high copy plasmid의 경우 200 ml의 배양액으로부터 복잡한 조작없이 plasmid를 분리할 수있어 편리한 점이 있다.

DMSO나 MeOH에 녹인 시료 1 ul를 5 ul의 DNA나 RNA 시료 (2 ug)와 혼합하여 42 °C에서 DNA의 경우 5 시간, RNA의 경우 30 분간 배양한 후 EtOH precipitation 시켜 건조시킨후 4 ul의 TE buffer에 녹여 1 % agarose gel에서 30 분간 전기영동한 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator상에서 그 형태를 control과 비교하였다. DNA cleavage의 경우 bleomycin을 positive control로 사용하였다. 본 실험 조건 (42 °C에서 30 분)의 경우 control로 사용된 16S rRNA는 거의 분해되지 않으나 RNA cleavage 효과를 보이는 물질의 경우 band가 사라지는 것으로 활성도를 판별할 수있다.

DNA 및 RNA cleavage assay 반응액 조성.

Reagent	amount	Final concentration
RNA or DNA	2 ug	0.2 ug/ul
Buffer (5 X)	2 ul	20 mM TE
Sample in MeOH	1 ul	
D.W.	6 ul	
total volume	10 ul	

6. 2. 4. Phospholipase A₂ inhibition

6. 2. 4. 1. 검색의 의미

Eicosanoids라고 하는 것들은 육상 생물에서 시작된 것으로 특히 동물들의 체 지방성분중의 하나인 arachidonic acid와 이들의 유도체들을 통칭하는 말이다. Arachidonic acid는 잘 알려진 바와 같이 prostaglandin이나 leukotrien등 유사 hormon 화합물의 전구체로 포유동물에서의 arachidonic acid의 산화대사는 signal transduction등 세포들의 정상 혹은 비정상 생리 현상을 조절하는 여러가지 다양한 구조와 기능의 대사 산물을 형성하게된다. 이러한 형태의 산화된 고도불포화지방산을 통칭하여 oxylipin이라하며 그 생성 대사과정은 3 종류의 효소들(cyclooxygenase, lipooxygenase, and cytochrome P450)에 의하여 시작된다. 이러한 경로의 생리학적 혹은 약학적 조절은 여러 종류의 질병들 (atherosclerosis, heart disease, cancer, psoriasis, ulcers and other inflammatory disorders)의 새로운 치료법의 가능성을 제시해주고 있다. Eicosanoid의 생성의 최초 단계는 phospholipid의 sn-2 위치에 존재하는 arachidonic acid가 PLA₂에 의하여 유리 지방산으로 전환되는 반응에서 시작된다. 따라서 이 초기단계의 효소반응의 저해제를 확보하는일은 이후 단계반응을 제어하는데 필수적이며 특히 이 저해제는 인체내에서 불필요한 통증을 유발하는 일련의 반응의 저해제로서 통증치료제로서의 의미를 지니고있다.

6. 2. 4. 2. 실험방법

가. Bacterial bioluminescence를 이용한 다수시료 검색법

기질로는 dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC, Sigma chemical co.)을 사용하였고 chloroform에 기질을 100 mg/ml로 녹인 뒤 동량의 5 % NaCl로 추출하여 소량 함유되어있는 유리 지방산 (이 경우 myristic acid)를 제거하고 10 ul씩 분주하여 speed-vac으로 solvent를 제거하고 -20 °C에서 보관하여 사용하였다. Phospholipase A₂는 Worthington enzymes에서 구입하여 사용하였고 50 mM TrisHCl buffer (pH 8.0, 0.1 M CaCl₂, 80 mM sodium deoxycholic acid)에 10 ul당 1 unit이 되도록 stock solution을 조제하여 0.1 ml씩 분주하여 -70 °C에서 보관하였다. 반응은 DMPC가 들어있는 0.5 ml eppendorf tube에 10 ul의 diethyl ether를 가한후 여기에 30 ul의 50 mM Tris buffer (pH 8.0)을 가하고 10 ul의 PLA₂ solution을 가하여 vortex로 혼합한 뒤 37 °C에서 20 분간 반응시켰다. 반응후 10 ul를 따서 camera luminometer용 63-well microplate의 well에 가하고 0.2 ml의 *Vibrio harveyi* M-17 suspension을 가한 후 microplate shaker로 30 초간 섞어준후 camera luminometer로 30 초간 expose시켜 Polaroid type 667 film으로 측정하였다 (Fig. X). 육안으로 control과 비교하여 대략적인 차이를 분석한 뒤 동일 시료를 다시 photomultiplier phototube를 사용한 luminometer로 절대광량을 측정하였다.

나. Gas chromatograph를 이용한 정밀 검색법

기질로는 sn-1 palmytoyl sn-2 linoleoyl phosphatidyl choline (PLPC, Sigma chemical co.) 을 사용하였고 이외의 반응은 DMPC의 경우와 동일하다. 단 반응후 0.2 ml의 chloroform:MeOH = 1:1 solution으로 반응액을 추출하고 추출액을 1 ul 파서 GC (HP5890II plus)로 분석하였다. 사용된 column등 분석조건은 제 5 장에서의 PLA₂ assay 방법과 동일하다.

6. 2. 5. Antimicrobial and antifungal activity

6. 2. 5. 1. 검색의 의미

다수의 시료에 대한 생리활성 검색을 수행할 때 검색 자체에 비용과 노력이 많이 필요하면 그 의미가 많이 퇴색되며 물질의 개발에 오히려 저해요인으로 작용하는 경우가 흔히 발견된다. 완전히 개념부터 새로운 검색 체계가 아닐 경우에는 오히려 비용과 노력이 가장 적게 들고 수달 된 인원이 필요하지 않은 그리고 가장 보편적인 활성을 추적하여 물질의 유무를 단시간에 파악하는 방법이 보다 효율적이다. 이에 가장 적합한 활성이 antifungal activity screening이다. 본 검색은 비단 antifungal activity 자체를 검색한다기보다는 이를 indicating activity로하여 신물질의 존재 유무를 파악하는 prescreening 방법으로 활용하고 있다. 이 방법은 비교적 신속하고 편리하며 결과를 확인하는데 clear zone의 지름을 측정하기 위한 자나 calipus 외에 별다른 분석기기가 필요하지않고 육안으로 판별하지만 비교적 정확하며 살아있는 미생물의 활성이나 분리정제 단계의 시료를 모두 쉽게 사용할 수있다. 이 방법은 그 자체만으로서는 가치가 많이 떨어지나 본 연구와 같이 효소저해활성 검색등의 target orient된 검색법과 병용할 경우 prescreenig으로서의 가치가 충분하다.

6. 2. 5. 2. 실험방법

혼합배양 평판배지 상에서 인접 균주의 성장을 저해하는 원형지역을 형성하는 균주를 주 대상으로 순수분리한후 6 mm paper disk 판별법을 이용하여 아래 명시된 균주들을 대상으로 항생 물질 생성 여부를 검색하였다. 각 plate를 6 등분하여 6 개의 시료를 동시에 검색하였다.

* 항세균물질 및 항진균물질 생산 검색에 사용된 균주.

E. coli,
B. subtilis,
Candida albicans,
Sacharomyces serevius,
Staphylococcus aureus

6. 3. 해양발광 세균의 이용방법 개발

새로운 이용방법을 개발하기 위한 해양생물 유래 유용효소로는 해양발광 세균의 발광 반응을 촉매하는 bacterial luciferase를 선정하였고 이의 새로운 응용방법은 기존의 미량 분석 방법을 개선, 대체할 수 있는 새로운 분석법의 개발과 이 효소의 유전자를 이용한 변형 균주의 개발에 주안점을 두었다.

Bacterial luciferase는 해양에서 서식하는 세균들중에서 발견되는 효소로서 특이한 발광 반응을 일으키는 효소이다. Bacterial luciferase를 갖고 있는 해양세균으로는 *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*, *Schewanella hanedai* 등이 있으며 어패류에서 여름철 vibrio 패혈증을 유발하는 *V. vulnificus* 중 몇몇 strain에서도 이 효소가 발견되고 있다. Bacterial luciferase는 그 특이한 발광 반응으로 그자체의 반응 기작이 흥미로울 뿐만아니라 이를 미량성분의 고감도 분석에의 응용또한 최근들어 큰관심을 끌고 있다. 그 이유는 본 효소의 반응 산물이 빛이므로 그 검출한계가 발색반응등 여타의 분석 방법에 비할수 없이 높아 방사성동위원소를 이용한 분석방법의 검출한계와 거의 동일한 수준이며 방사성 동위원소에 의한 분석방법이 많은 유해 오염원으로 작용하여 많은 환경 문제를 야기시키고 있는데 반하여 오염물질 배출이 전무한 소위 clean (or Green) assay method로 인정되고 있기 때문이다. 본 효소에 기인한 발광 반응의 이용은 크게 발광 세균 그자체를 이용하는 방법과 분리된 효소 혹은 세포내 추출물을 이용하는 방법, 그리고 본 효소를 생산하는 유전자 (Lux gene system)을 이용하는 방법등 크게 3분야로 구별할수 있다.

6. 3. 1. 발광 세균 그자체의 이용

Vibrio harveyi M-17을 이용하여 myristic acid를 정량하는 방법에 주력하였다.

6. 3. 2. Bacterial luciferase의 분리 정제

*Vibrio harveyi*의 경우 sea water complete 배지 (5 g Tryptone, 3 g yeast extract, 3 ml

glycerol in 1 liter of 70 % aged sea water, pH 7.0)에서 배양하여 cell mass가 5 g/l 정도일때 0.2 um pore size의 tangential flow filter (3,500 cm² surface, Microgon Co., USA)를 이용하여 2 liter로 농축시키고 High speed centrifuge (Vision Science Co., Korea)로 8,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 균체를 수확하였다. 100 g의 균체를 얻은후 이를 멸균된 비닐 봉지에 넣어 두께 1 cm 되는 시루떡 형태로 모양을 잡아 영하 20 °C에서 하룻밤 얼린후 다음날 녹인후 다시 얼리기를 2 차례 반복하여 세포벽 구조를 약화 시키고 여기에 미리 4 °C로 식혀둔 900ml의 lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 cold room에서 1 시간동안 교반 시킨다. 이 과정에서 염농도가 높은 배지에서 자란 균체들이 염농도가 낮은 lysis buffer에서 삼투압 차이에 의하여 터지는 소위 osmotic lysis에 의하여 세포내 물질들이 녹아 나오게된다. 세포파괴를 보다 확실히 하기위하여 초음파분쇄기 (Fischer Co., USA)를 이용하여 얼음물에 담근 상태에서 1 분간 초음파를 가하고 1 분간 교반 시키는 과정을 5 회 반복한다.

세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기위하여 GSA rotor를 이용하여 10,000 rpm 에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이상등액에 DEAE-cellulose를 가하여 30 분간 교반한후 column (5 cm x 50 cm)에 충전하였다. DEAE-cellulose에 흡착되지 않은 물질들을 흘려 내리고 500 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin을 씻어 약하게 흡착된 물질들을 제거한다. 다시 500 ml의 150 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin을 씻어 중간정도로 흡착된 물질들을 제거한후 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0)로 흡착된 luciferase를 용출시킨다. 이때는 fraction collector (Eyela DC-1200)을 이용하여 10 ml 씩 분취하여 각각의 luciferase활성도와 단백질 함량을 측정한후 luciferase활성도를 보이는 분액들을 합친후 이를 ammonium sulfate농도 35 %와 75 % 사이에 침전된 침전물을 회수하였다. 이를 20 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인후 Sephadex G-25 desalting column으로 ammonium sulfate를 제거한뒤 DEAE-Sephadex column (2.5 cm x 30 cm)에 가하고 column을 100 ml의 동일한 buffer로 씻어준다. 여기서 50 mM에서 500 mM 까지 phosphate buffer 농도구배로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 luciferase활성도를 보이는 분액을 회수하여 1 ml 씩 eppendorf tube에 나누어 -70 °C에 보관하며 필요할 때 사용하였다.

이를 고순도로 손쉽게 분리하는 방법을 개발하고 있으며 이는 주로 본 효소의 cofactor인 FMN을 ligand로 사용한 affinity chromatography system을 개발하였다. FMN을 CN-Br activation method로 agarose에 covalent bonding으로 부착시킨 FMN-Agarose resin에 1.0 M phosphate buffer에 녹아있는 luciferase solution을 흡착시킨후 이를 0.1 M phosphate buffer를 사용하여 elution 시키는 방식이 가장 효과적이었다.

6. 3. 3. 해양발광세균을 이용한 항생물질 검색법

기존의 paper disk방법은 활성도를 검색하는데 최소한 하루의 배양시간을 필요로 하므로 물질의 분리정제등과 같이 신속히 활성도 유무를 검사하는데는 다소 문제가 있어 이를 위하여 해양

발광 세균 (*Vibrio harveyi*)을 이용하여 신속한 검색법을 고안하였다.

그 방법은 late exponential phase의 균체를 3 % NaCl 용액에 $A_{600\text{ nm}}$ 값이 약 0.1 정도되게 희석한후 이를 각각 1 ml 씩 취하여 20 ml들이 scintillation vial 2 개에 나누어 넣고 대조균주에는 10 μl 의 methanol 그리고 실험균주에는 10 μl 의 methanol에 녹아있는 sample을 가하고 luminometer에서 방출되는 빛의 변화를 5 분 간격으로 관찰한다. 또는 0.2 ml의 *Vibrio harveyi* suspension을 camera luminometer용 63-well microplate의 well에 가하고 대조균주에는 10 μl 의 methanol 그리고 실험균주에는 10 μl 의 methanol에 녹아있는 sample을 가하고 microplate shaker로 30 초간 섞어준후 camera luminometer로 30 초간 expose시켜 Polaroid type 667 film으로 측정하였다. 육안으로 control과 비교하여 대략적인 차이를 분석한 뒤 동일 시료를 다시 photomultiplier phototube를 사용한 luminometer로 절대광량을 측정하였다.

6. 3. 3. 1. *Vibrio harveyi*발광 유전자 이용한 발광 *B. subtilis* 제조

해양 발광 세균 *Vibrio harveyi* B392는 Gram (-) 균주로서 Gram (-) 균주를 대상으로하는 antibiotic assay에는 그냥 적용이 가능하나 Gram (+) 균주의 경우에도 적용하기 위하여 *B. subtilis*를 대상으로하여 발광 유전자 (*luxA*, *luxB* gene)으로 transformation시켰다. 발광 유전자는 Xi 등 (1990)에 의하여 *Vibrio harveyi* B392로부터 cloning 되어 pBR322 plasmid에 접합된 형태 (pTH₂)로 이를 함유하고 있는 *E. coli* HB101 균주에서 분리되었다.

배양된 균체 약 30 mg정도를 1.5 ml eppendorf tube 에 넣고 100 μl lysis buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 가하여 현탁한 후 10 μl Lysozyme 용액 (50 mg/ml)을 가하여 실온에서 5 분간 방치한 후 0.2 ml의 SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 (1 % SDS, 0.2 N NaOH) 를 가하여 섞어 준 후 얼음에서 5 분간 방치하여 cell membrane을 용해시킨다음 150 μl 의 potassium acetate 용액을 가하여 SDS를 침전 시키고 4 C 에서 5 분간 원심 분리하여 SDS와 cell debris 를 제거한다. 상층액을 취하여 phenol:chloroform =1:1 solution으로 추출하여 단백질을 제거한후 원심 분리하여 층을 나누고 다시 상층액만을 취하여 2 배 부피의 absolute ethanol 을 가하여 plasmid DNA를 침전시킨다. 4 °C 에서 10 분간 원심 분리하여 DNA를 얻은후 70 % Ethanol로 씻어 준후 50 μl 의 Tris buffer 로 녹인다. Bromophenol blue 와 zylene cyanol FF 가 포함된 loading solution (50 % glycerol) 2 μl 를 DNA시료 10 μl 에 가한 후 1 % agarose gel에 loading 하고 100 volt에서 약 30 분간 전개한다. 전개가 완료된 gel plate 를 ethidium bromide 용액에 담가 염색시킨 후 자외선등아래서 DNA band를 확인하고 pTH₂ 를 함유한 gel을 올려내어 electroelution으로 pTH₂를 gel에서 추출한후 ethanol precipitation step을 거쳐 plasmid DNA를 정제한다.

분리된 pTH₂ plasmid를 electrophorator (Cellject-100)를 이용하여 균체에 강제 주입하여 transformation을 수행하였다. 4 mm cell을 사용하여 2,500 Volt에서 transformation을 수행한뒤 ampicilin 과 chloroamphenicol을 함유한 LB-agar plate에 도말하여 성장하는 균주를 회수하여

agarose electrophoresis를 통하여 plasmid의 transformation을 확인하였다. 동시에 decanal 증기하에서 형성된 colony에서 발광 여부를 확인하여 luciferase의 발현 여부를 확인하였다. *B. subtilis*의 transformation은 용이하게 이루어지나 주입된 plasmid가 쉽게 손실되어 발광 능력이 2-3 차례의 계대후에는 거의 완전히 상실되었다. *B. subtilis*와 같은 Gram(+) 균주를 lux gene으로 transformation하는 것은 비단 antibiotic assay 뿐만아니라 Bt 제제같은 생물 농약의 monitorig에도 응용될 수있으므로 높은 가치가 있다. 따라서 본 과제는 *B. subtilis*의 chromosomal DNA 내로 lux gene을 유입시키는 과정이 필요하며 이를 위한 연구가 2 단계연구에도 계속하여 수행될 예정이다.

제 7 장 결 론

해양천연물 연구는 지난 30여 년 간 눈부시게 발전하여 왔다. 이미 7,000여에 달하는 신물질의 특이한 구조는 종래의 유기화학이나 천연물화학에서 인식되어 왔던 유기물질에 대한 개념 자체를 변화시켰으며 다수의 해양천연물이 나타내는 강력한 생리활성 효과와 독특한 반응기작은 의·약학과 생물·생태학에 속하는 여러 분야의 기초 및 응용연구에 막대한 기여를 하여왔다. 산업적인 면에서도 이미 60 이상의 해양생물 유래 생리활성 물질이 특허를 획득하여 의약품, 건강보조제, 기능성 화장품 등으로 개발중이며 유용효소와 고분자 물질의 산업적 이용을 위한 연구노력도 매우 활발하다.

60년대이래 선진국에서의 해양생물 유래 신물질과 유용물질에 대한 연구노력은 지속적으로 증가하여 왔다. 더욱이 오랜 기간 유용물질의 보고 역할을 하여 왔던 육상생물로부터 천연물의 개발이 근년에 이르러 점차로 정체되어 가는 경향을 나타냄에 따라 해양생물의 중요성이 더욱 부각되어 집중적인 연구를 하고 있다. 선진국뿐만 아니라 여러 개도국에서도 해양생물을 더이상 단순한 식량자원으로만 보지 않고 유용물질의 원천으로 인식하고 있으며 이에 따라 국가간의 자원확보 경쟁의 차원에서 자국내 해양생물을 취급하는 국가가 증가하고 있는 실정이다. 반면 국내에서는 천혜의 해양환경에 따른 무수한 동·식물과 미생물이 근해에 서식함에도 불구하고 인식과 전문연구 인력의 부족으로 유용물질의 연구대상이 육상식물과 미생물에 국한되어 있으며 해양생물은 거의 주목을 받지 못하고 있다.

본 연구진에서는 체계적인 해양생물 유래 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기초연구로서 우리나라와 남극 근해에 서식하는 저서군체 동물로부터 신물질 추출, EPA 생산균주의 개발 등을 비롯한 수개의 연구과제를 성공적으로 수행한 바 있으며 이를 기초로 하여 해양생물로부터 신물질과 유용물질을 개발하기 위한 본 장기연구과제를 수행하게 되었다.

본 제1단계의 연구목표는 기반기술의 확립으로서 중점 연구내용은 연구대상 생물시료의 확보, 생리활성 탐색방법의 확립등 장기적이고 체계적인 연구를 위한 기반을 확충하고 중점 연구대상 생물 시료의 선정, 이들로부터 신물질 분리, 구조결정 및 생리활성도 측정, 해양미생물 균주의 분리 및 보존, 생리활성 스크리닝에 의한 유용균주의 선정 및 배양, 유용물질의 분리 정제 및 생화학적 특성파악등이다. 이와 아울러 기존 생리활성 측정방법의 문제점을 개선한 새로운 측정방법의 개발도 함께 시도하였다.

제 1차년도에서는 중요 생리활성도 중의 하나인 항암효과 측정 체계의 확립을 위하여 기존의 항암 및 암기작 관련 효소의 저해도 측정방법과 해당 생리활성 물질에 관한 자료를 수집, 분석하였다. 연구대상 시료의 확보를 위하여 남해안의 여러 해역에서 다양한 저서 군체동물 시료를 채집하였으며 생리활성도 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 수 종의 시료를 중점 연구 대상으로 선정하여 천연물을 탐색한 결과 10종의 신물질을 비롯한 18종의 천연물을 분리하여 구조결정을 완료하고 생리활성을 측정하였다. 또한 우리나라 근해, 동해와 태평양 심해저, 남

극연안 등지로부터 1,500여 해양세균과 150여 방선균 균주를 분리하였으며 세포독성, 효소저해, 항균 및 항진균 검색결과 활성이 우수한 균주를 선별하였다. 또한 거대물질과 신호소체의 개발을 위하여 4종의 유용효소에 대한 활성 측정방법을 개발하였으며 전기한 미생물을 대상으로 한 검색결과가 우수한 균주를 선정하였다.

제 1차년도 연구 결과를 기초로 하여 본 제 2, 3차년도에서는 종합적인 천연물연구를 집중적으로 수행한 바 주요 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 남해안에 서식하는 gorgonians *Muricella* spp., *Euplexaura anastomosans*등으로부터 diterpenoids와 carotenoid pigment, secosteroids, steroidal hemiacetals등 9종의 신물질들을 포함하는 15종의 천연물을 분리하였다. Hydroid *Solanderia secunda*로부터 9종의 신규 C₂₂ cyclopropyl oxylipin계 신물질을 분리하였으며 다수의 유도체를 합성하였다. 또한 sponges *Petrosia corticata*, *Caminatus awashimensis*와 1종의 미확인 종으로부터 4종의 신물질등 11종의 polyacetylenes, cyclitol-containing glycolipids등을 분리하였다. 분리한 거의 모든 천연물은 NMR, 질량분석등 분광자료의 해석과 화학적 변환에 의하여 구조결정을 완료하였다. 천연물중 다수가 세포독성, 효소저해 등의 생리활성 효과를 갖고 있음을 확인하였으며 현재 더욱 광범위한 활성을 검색중이다.

2. 남, 서해안의 연안, 동해와 태평양의 심해저, 남극연안의 퇴적물과 저서생물로부터 2,000여 방선균을 포함하는 7,000여 해양미생물 균주를 분리, 보존하였으며 항진균활성과 효소활성이 우수한 균주들을 선별하였다. 선정된 균주로부터 2 종류의 superoxide dismutase, extracellular phospholipase A₁ 등 유용효소를 순수하게 분리하여 생화학적 특성의 파악을 완료하였다.

3. Retrovirus의 생존 필수효소인 reverse transcriptase, eicosanoid의 생합성에 관여하는 phospholipase A₂ 등의 효소에 대한 저해 활성과 항산화 활성을 포함하는 수종의 생리활성 검색방법을 확립하였으며 RNA cleavage 활성 검색과 기존의 DNA cleavage 활성 검색법을 개선하였고 해양박테리아의 발광현상을 이용하여 신규 항세균활성 검색방법을 개발하였다.

요약하여 본 제 1단계에서는 장기적인 해양생물 유래 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기반이 확립되었으며 우리나라 근해의 저서생물로부터 32종의 신물질을 포함하는 50여종의 천연물을 분리, 구조를 결정하였다. 생리활성물질과 유용효소를 생산하는 다수의 해양 미생물 균주가 분리되었으며 유용효소를 분리정제하여 생화학적 특성을 파악하였다. 또한 생리활성 검색체계 구축작업의 일환으로서 신규 검색방법의 개발을 포함하는 다수의 생리활성 검색방법을 확립하였다. 이와 같은 연구결과를 바탕으로하여 향후의 제 2단계 연구에서는 보다 산업화의 가능성이 높은 천연물 연구에 주력할 계획이다.

해양생물로부터 신물질과 유용물질을 개발하는 연구는 학문적, 산업적 가능성이 무한한 분야이나 국내에서는 인식의 부족으로 오랜 기간 연구가 활성화되지 못하였다. 그러나 본 제 1단계의 연구에서 얻어진 결과는 국내에서도 이 분야의 연구가 충분한 가능성을 갖고 있음을 입증하였다. 이와같은 연구결과를 바탕으로 하여 체계적이고 지속적인 연구 노력을 기울일 경우 우수한 결과가 양산될 것이다.

참 고 문 헌

- 한국해양연구소, 해양천연물 연구를 위한 중·장기 계획수립, BSPE 00225-340-4
- 한국해양연구소, 해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구, BSPN 00255-801-4
- R. Adinolfi, A. Migliuolo, A. Piccialli, and V. Sica, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1200.
- A. Aiello, E. Fattorusso, and M. Menna, *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1275.
- A. Aiello, E. Fattorusso, M. Menna, and M. Pansini, *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1275.
- K. Ando, I. Matsuura, Y. Nawata, H. Endo, I. Sasaki, T. Okytomi, T. Saechi, and G. Tamura, *J. Antibiot.*, **1978**, *31*, 533.
- S. J. Angyal and B. M. Luttrell, *Aust. J. Chem.*, **1970**, *23*, 1831
- T. Aoyagi, T. Yamamoto, K. Kojiri, H. Morishima, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **1989**, *42*, 1008.
- S. W. Baertschi, A. R. Brash, and T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5003.
- R. A. Barrow and R. J. Capon, *Aust. J. Chem.*, **1994**, *47*, 1901.
- K. Bartik, J. C. Braekman, D. Daloze, C. Stoller, J. Huysecom, G. Vandevyver, and R. Ottinger, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2118.
- P. R. Bergquist and R. J. Wells, In P. J. Scheuer Ed. *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Vol V. Academic Press, New York, **1983**, 1.
- M. W. Bernart, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II and M. R. Boyd, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 993.
- C. Bonini and C. B. Cooper, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 2108.
- S. Borman, *S. Chem. Eng. News*, **1992**, June 15, 5.
- J. C. Braekman, D. Daloze, N. Defay, and D. Zimmermann, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1984**, *93*, 941.
- J. C. Braekman, D. Daloze, P. M. de Abreu, C. Piccinni-Leopardi, G. Germain, and M. van Meersche, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 4277.
- A. R. Brash, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 1891.

- A. R. Brash, S. W. Baertschi, C. D. Ingram, and T. M. Harris, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 15829.
- E. Breitmaier and W. Voelter, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 3rd ed., VCH, New York, **1990**, 192.
- D. L. Burgoyne, R. J. Andersen, and T. M. Allen, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6637.
- A. Buter and J. V. Walker, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1937.
- N. M. Carballeira and A. Emiliano, *Lipids*, **1993**, *28*, 763.
- N. M. Carballeira and F. Shalabi, *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 739.
- R. J. Capon and D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 4771.
- D. Castiello, G. Cimino, S. de Rosa, S. de Stefano, and G. Sodano, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 5047.
- K. W. Cho, *Kor. J. Biochem.*, **1994**, *27*, 522.
- P. Ciminiello, W. Fenical, and P. J. Paul, *Experientia*, **1990**, *46*, 980.
- G. Cimino, A. de Giulio, S. de Rosa, and V. Di Marzo, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 3563.
- G. Cimino, A. de Giulio, S. de Rosa, and V. Di Marzo, *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 345.
- G. Cimino, A. de Giulio, D. de Rosa, S. de Stefano, and G. Sodano, *J. Nat. Prod.*, **1985**, *48*, 22.
- G. Cimino and S. de Stefano, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 1325.
- T. W. Cline, and J. W. Hastings, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1971**, *68*, 500.
- F. G. Cocu and Th. Posternak, *Helv. Chim. Acta*, **1971**, *54*, 1676.
- V. Costantino, E. Fattorusso, and A. Mangoni, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 186.
- V. Costantino, E. Fattorusso, and A. Mangoni, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1726.
- P. Crews, L. V. Manes, and M. Boehler, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2797.
- D. J. Critcher, S. Connolly, M. F. Mahon, and M. Wills, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 139.
- D. J. Critcher, S. Connolly, and M. Wills, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 3763.

- J.-R. Dai, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, and M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.*, **1996**, *59*, 88.
- J.-R. Dai, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, G. N. Gray, and M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.*, **1996**, *59*, 860.
- M. V. D'Auria, L. Minale, and R. Riccio, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1839.
- M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, and R. Riccio, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 2149.
- M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, R. Riccio, A. Zampella, and C. Debitus, *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 418.
- E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13057.
- E. A. Dennis, In P. D. Boyer Ed. *The Enzymes*, Academic press, NY, 307.
- V. H. Deshpande, B. K. Upadhye, and R. D. Wakharkar, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 1991.
- E. D. de Silva and P. J. Scheuer, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611.
- E. Dies and S. Mong, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 14654.
- M. Dorta de Marquez and V. Thaller, *J. Chem. Res(S)*, **1985**, 104.
- E. L. Enwell, D. Van Der Helm, I. Nan Hsu, T. Pattabkiran, F. J. Schmitz, R. L. Spraggins, and A. J. Weinheimer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1972**, 215.
- D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **1984**, *1*, 551.
- D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **1986**, *3*, 1.
- D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **1988**, *5*, 613.
- D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **1995**, *12*, 223.
- D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, 75 and references cited therein.
- H. J. Federsel, *CHEMTECH* **1993**, december, 24.
- I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *264*, 7761.
- N. Fusetani, H. Li, K. Tamura, and S. Matsunaga, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 1203.
- N. Fusetani, Y. Kato, S. Matsunaga, and K. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 2771.

- N. Fusetani, S. Matsunaga, H. Matsumoto, and Y. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053.
- N. Fusetani, H. Nagata, H. Hirota, and T. Tsuyuki, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 7079.
- N. Fusetani, T. Shiragaki, S. Matsunaga, and K. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 4313.
- N. Fusetani, M. Sugano, S. Matsunaga, and K. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 4311.
- M. J. Garson, M. P. Zimmermann, M. Hoberg, R. M. Larsen, C. N. Battershill, and P. T. Murphy, *Lipids*, **1993**, *28*, 1011.
- W. H. Gerwick, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1807.
- G. Guella, I. Mancini, and F. Pietra, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 77.
- G. Guella, I. Mancini, and F. Pietra, *Helv. Chim. Acta.*, **1987**, *70*, 1050.
- S. P. Gunasekera and G. T. Faircloth, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 6223.
- S. P. Gunasekera, M. Gunasekera, and R. E. Longley, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1346.
- Y. Guo, M. Gavagnin, E. Trivellone, and G. Cimino, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13261.
- Y. Guo, M. Gavagnin, E. Trivellone, and G. Cimino, *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 712.
- Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, M. S. Balaschak, M. R. Alexander, T. R. Prather, R. H. Shoemaker, and M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1801.
- J. W. Hastings, T. O. Baldwin, and M. Z. Nicoli, In M. DeLuca, Ed. *Methods in Enzymology*, Vol. 57, Academic Press, NY, **1978**, 135.
- H. He, P. Kulanthaivel, B. J. Baker, K. Kalter, J. Darges, D. Cofield, L. Wolff, and L. Adams, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 51.
- M. D. Higgs and L. J. Mulheirn, *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 4259.
- Y. Hirata and D. Uemura, *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701.
- S. Hirsh, S. Carmley, and Y. Kashman, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 3257.
- M. Hosokawa, H. Oshima, H. Kohno, K. Takahashi, M. Hatano and S. Odashima, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1993**, *59*, 309.

- T. Hu, J. Marr, A. S. W. deFreitas, M. A. Quilliam, J. A. Walter, J. L. C. Wright, and S. Pleasance, *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1631.
- J. C. Hunter-Cevera and L. Sotos, *Microb. Ecol.*, **1986**, *12*, 121.
- T. Ichiba, P. J. Scheuer, and M. Kelly-Borges, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2814.
- I. Iguchi, M. Kitade, T. Kashiwagi, and Y. Yamada, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 5690.
- C. M. Ireland, D. M. Roll, T. F. Molinski, T. C. McKee, T. M. Zabriskie, and J. C. Swersy, In D. G. Fautin, Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences, San Francisco, **1987**, 41.
- S. Isaacs, Y. Kashman, S. Loya, A. Hizi, and Y. Loya, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 10435.
- M. Ishibashi, C.-M. Zeng, and J. Kobayashi, *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 1856.
- B. L. Kam and N. Oppenheimer, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 3268.
- S. J. Kim, D. Han, M. H. Park, and J. S. Rhee, J.S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, *58*, 2263.
- R. Kazlauskas, P. T. Murphy, B. N. Ravi, R. L. Sanders, and R. J. Wells, *Aust. J. Chem.*, **1982**, *35*, 69.
- R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Well, and P. Schonholzer, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 4643.
- H. Kigoshi, H. Niwa, K. Yamada, T. J. Stout, and J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 2427.
- D. K. Kim, P. G. Suh, and S. H. Ryu, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1991**, *174*, 189.
- J. Kobayashi, C.-M. Zeng, and M. Ishibashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 79.
- J. Kobayashi, K. Naitoh, K. Ishida, H. Shigemori, and M. Ishibashi, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1300.
- M. Kobayashi, K. Kawazoe, and I. Kitagawa, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4149.
- M. Kobayashi, K. Kobayashi, K. V. Ramana, C. V. L. Rao, D. V. Rao, and C. V. Rao, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1991**, 493.
- M. Kobayashi, T. Mahmud, H. Tajima, W. Wang, S. Aoki, S. Nakagawa, T. Mayumi, and I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, *44*, 720.
- R. Koljak, T. Pehk, I. Jarving, M. Liiv, A. Lopp, K. Varvas, A. Vahemets, U. Lille, and N. Samel, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1985.

- K. Kondo, H. Shigemori, Y. Kikuchi, M. Ishibashi, T. Sasaki, and J. Kobayashi, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2480.
- S. Koshiro, K. Sonomoto, A. Tanaka, and S. Fukui, *J. Biotechnol.*, **1985**, *2*, 47.
- B. A. Kulkarni, S. Chattopadhyay, A. Chattopadhyay, and V. R. Mamdapur, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 5964.
- S. O. Lee, I. Kim, I. I. Uno, and T. H. Lee, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, *57*, 1454.
- H. Li, S. Matsunaga, and N. Fusetani, *Experientia*, **1994**, *50*, 771.
- D. K. Lee, J. K. Jung, K. P. Kim, C. Yon, J. W. Suh, C. O. Kim, B. C. Hyun, S. H. Kim, Y. H. Lim, and C. H. Lee, *Kor. Biochem. J.*, **1993**, *26*, 625.
- H.-Y. Li, S. Matsunaga and N. Fusetani, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1464.
- S. Liaaen-Jensen, In P. J. Scheuer, Ed. *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspective*, Vol. II. Academic press, New York, **1978**, 1.
- A. Madaio, G. Notario, V. Piccialli, and D. Sica, *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 565.
- A. Madaio, V. Piccialli, and D. Sica, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 5999.
- T. Matsuno, M. Ookubo, and T. Komori, *J. Nat. Prod.*, **1985**, *48*, 606.
- S. Miao and R. J. Anderson, *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 1433.
- A. M. Michelson and J. Monod, US patent, **1975**, 3 920 521
- A. Migliuolo, V. Piccialli, and D. Sica, *Steroids*, **1992**, *57*, 344.
- T. F. Molinski, E. Fahy, D. J. Faulkner, G. D. van Duyne, and J. Clardy, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 1340.
- G. P. Moss, *Pure & Appl. Chem.*, **1976**, *47*, 97.
- D. G. Nagle and W. H. Gerwick, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 2995
- D. G. Nagle and W. H. Gerwick, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7227.
- Y. Nishimura, Y. Umezawa, H. Adachi, S. Kondo, and T. Takeuchi, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 480.
- H. Niwa, K. Wakamatsu, and K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4543.

- M. Ochi, S. Arika, A. Tatsukawa, H. Kotsuki, Y. Fukuyama, and K. Shibata, *Chem. Lett.*, **1994**, 89.
- M. Ochi, K. Yamada, H. Kotsuki, and K. Shibata, *Chem. Lett.*, **1991**, 427.
- S. Ohta, H. Okata, H. Kobayashi, J. M. Oclarit, and S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 5935.
- M. Ojika, Y. Yoshida, Y. Nakamura, and K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 4907.
- Y. Oyazagui, In Bannister and Banister, Ed., *Biological and Clinical aspect of Superoxide and Superoxide Dismutase*, Vol. IIB, Elsevier, New York, **1980**.
- A. D. Patil, W. C. Kokke, S. Cochran, T. A. Francis, T. Tomszek, and J. W. Westley, *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1170.
- N. B. Perry, E. G. Becker, J. W. Blunt, R. J. Lake, and M. H. G. Munro, *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 732.
- G. R. Pettit, Z. A. Cichacz, F. Gao, C. L. Herald, M. R. Boyd, J. M. Schmidt, and J. N. A. Hooper, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1302.
- J. Pika and R. J. Andersen, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 8757.
- P. J. Proteau, J. V. Rossi, and W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1717.
- E. Quinoa and P. Crew, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 2037.
- R. J. Quinn and D. J. Tucker, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 1671.
- R. J. Quinn and D. J. Tucker, *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 290.
- J. M. Renoux and M. Rohmer, *Eur. J. Biochem.*, **1985**, *151*, 405.
- L. J. Reynolds, L. L. Hughes, and E. A. Dennis, *Anal. Biochem.*, **1992**, *204*, 190.
- K. L. Rinehart, In D. G. Fautin, Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences, San Francisco, **1987**, 13.
- M. Rotem and Y. Kashman, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 3193.
- V. Roussis, W. Fenical, and C. Harvala, *Experientia* **1993**, *49*, 265.
- H. Z. Sable, T. Anderson, B. Tolhert, and T. Posternak, *Helv. Chim. Acta*, **1963**, *46*, 1157.

- F. J. Schmitz and Y. Gopichand, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 3637.
- Y. Seo, J. Shin, and J.-I. Song, *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1291.
- K. Tachibana, P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand, and F. J. Schmitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2469.
- H. Tada and F. Yasuda, *Chem. Lett.*, **1984**, 779.
- M. Taniguchi, K. Hoshino, T. Itoh, H. Kumakura, and M. Fujii, *Biotech. Bioeng.*, **1992**, *39*, 886.
- S. Ulizer and J. W. Hastings, In M. DeLuca Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 57, Academic Press, NY, 189.
- H. Van den Bosch, *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, *604*, 191.
- J. D. White and M. S. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2970.
- J. D. White and M. S. Jensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 6224.
- P. F. Wiley, H. K. Jahnke, F. MacKellar, R. B. Kelly, and A. D. Argoudelis, *J. Org. Chem.*, **1970**, *33*, 1420.
- A. E. Wright, O. J. McConnell, S. Kohmoto, M. S. Lui, W. Thompson, and K. M. Snader, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 1377.
- L. Xi, K. W. Cho, M. E. Herdon, and S.-C. Tu, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 4200.
- T. M. Zabriskie, J. A. Klocke, C. M. Ireland, A. H. Marcus, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, C.-F. Xu, and J. C. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123.

위탁과제

연구과제명: 항바이러스 약효검색

연구기간: 1995. 5. 1 - 1996. 4. 30

연구기관명: 한국화학연구소
스크리닝부

연구책임자 : 이 종교

연구원 : 김 지현

김 해수

피 미경

요 약 문

I. 제목

항바이러스 약효검색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항바이러스물질을 개발하기 위하여 해양생물로부터 분리된 물질들의 항바이러스활성을 평가함을 목적으로 하였다. 일차로 대량검색이 가능한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사하고 광범위 효과를 알기 위하여 cytomegalovirus와 poliovirus, coxsackie B virus, vesicular stomatitis virus에 대한 약효도 함께 평가함을 목표로 하였다. 신약개발시 시험 물질이 개발목표로 하는 분야에 대한 약효를 지니는가가 확인되어야 다음 개발 단계를 거칠 수 있기 때문에 항바이러스제개발을 위해 준비되는 시료의 약효평가는 필수적이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

해양생물로부터 분리된 물질들을 일차로 Vero 세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법으로 함께 조사하였다. 광범위 효과를 알기 위하여 cytomegalovirus와 poliovirus, coxsackie B virus, vesicular stomatitis virus에 대한 약효도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

한국해양연구소에서 해양생물로부터 분리되어 의뢰된 40개의 시료에 대한 항바이러스약효를 평가하였다. 모든 시료에 대하여 일차로 Vero세포체계에서 HSV-1과 HSV-2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였다. 아울러 CPE저해법을 이용하여 CMV와 HeLa 세포체계에서 RNA virus 인 PV-1, CoxB3와 VSV에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행되었다. 시험된 바이러스에 대하여 뚜렷한 약효를 나타내는 물질이 아직 발견되지 않았으나, 신약을 개발하기 위하여 앞으로도 많은 시료에 대한 지속적인 약효검색이 요구된다.

一、

二、

三、

四、

五、

六、

七、

八、

SUMMARY

For the development of new antiviral agents in vitro evaluation of antiviral activity of the compounds derived from marine organisms has been performed. To evaluate anti-herpetic efficacy Vero cells were infected with HSV-1 or HSV-2 and sensitivity to test compounds was measured by CPE inhibition assay. Anti-CMV activity was measured by CPE inhibition assay and HEL 299 cells were used for it. In HeLa cell culture system antiviral activity against poliovirus, coxsackie B3 virus and vesicular stomatitis virus was also tested by using CPE inhibition assay. 40 compounds were tested for their antiviral activity. No compound showed the significant antiviral activity against the tested viruses.

The first part of the text discusses the importance of understanding the context of a document. It emphasizes that context is crucial for interpreting the meaning of words and sentences. The text then moves on to discuss the importance of understanding the author's perspective and the audience's expectations. It suggests that readers should be aware of the author's biases and the audience's needs. The text concludes by stating that understanding context is essential for effective communication.

목 차

제 1 장 서론	301
제 2 장 연구추진방법	303
제 1 절 연구내용	303
제 2 절 실험재료	303
1. 세포	303
2. 바이러스	303
3. 시험물질 및 표준물질	303
제 3 절 실험방법	304
1. 세포배양	304
2. 바이러스증식	304
3. 바이러스역가측정	304
4. 항 herpes simplex virus 약효검색	305
5. 항 cytomegalovirus 약효검색	305
6. 항 poliovirus 약효검색	305
7. 항 coxsackie B virus 약효검색	305
8. 항 vesicular stomatitis virus 약효검색	306
9. 세포독성검사	306
10. MTT검색법	306
제 3 장 연구결과 및 고찰	308
제 1 절 항 herpesvirus 약효검색	308
1. 항 herpes simplex virus 약효검색	308
2. 항 cytomegalovirus 약효검색	308
제 2 절 항 RNA virus 약효검색	309
1. 항 enterovirus 약효검색	309
2. 항 vesicular stomatitis virus 약효검색	309
제 4 장 결론	317
제 5 장 참고문헌	318

제 1 장 서론

천연두, 홍역, 소아마비등의 바이러스 질환들은 백신접종에 의한 면역요법으로 예방이 성공적으로 이루어지고 있으나 항원의 빈번한 돌연변이, 다양한 항원을 가지고 있는 바이러스들, 또는 잠복감염이나 발병도중 viremia (바이러스가 혈액으로 퍼지는 현상)가 잘 나타내지 않는 바이러스에 대한 백신개발은 아직 어려운 형편이다.⁽¹⁾ 분자생물학, 생화학등의 근대과학의 큰 발전에 힘입어 바이러스질환의 진단이 용이해지고 증식기작 및 질병기작 이해에 급속한 진전이 있었고 후천성면역결핍증 (AIDS: acquired immunodeficiency syndrome) 등의 바이러스질환의 창궐로 인하여 바이러스치료제 개발연구가 최근부터 활발히 진행되어 왔다. 그러나 아직 공인된 치료제 수가 적고 그나마 치료가 허용된 바이러스종류도 주로 AIDS 바이러스 (HIV: human immunodeficiency virus), herpes simplex virus (HSV)와 cytomegalovirus (CMV)에 불과하고 약물의 종류는 대부분 핵산유도체들이다.^(2,3) 최근에 바이러스증식기작에 관한 새로운 지식과 정보 공급에 힘입어 바이러스특이기작 저해를 목적으로 하는 물질개발에 대한 시도가 많아졌고, 다른 구조와 기능을 가진 물질개발에 대한 관심이 높아지고 있으나 아직도 대량 검색에 의한 새로운 물질발견 가능성이 더 큰 편이다.

사람에게 감염하는 HHV는 현재 8가지가 알려져 있는데 (표 1), 가장 최근에 밝혀진 HHV type 7을^(4,5) 제외하고는 모두 다양한 질병을 유발함이 알려져 있다. 이들중 HSV-1과 HSV-2와 VZV와 Epstein-Barr virus와 CMV는 모두 AIDS 환자의 바이러스에 의한 기회감염의 주원인균들로 알려져 있고, CMV는 환자 죽음의 직접적인 원인이 되기도 한다.^(6,7) 장미진의 원인균으로 최근에 밝혀진 HHV type 6는 AIDS 환자의 질병을 촉진시키는 역할을 하는 human immunodeficiency virus (HIV)의 cofactor일 가능성이 큰 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾ 따라서 HHV는 바이러스질환치료제의 개발대상으로서 큰 관심을 끌고 있다. HHV질환 치료제로는 HSV와 VZV와 CMV치료제만이 공인되어 있는데 약효와 독성면에서 가장 우수한 약물로서 인정되는 acyclovir (ACV)의 경우에도 HSV type 1 (HSV-1)과 HSV type 2 (HSV-2)와 varicella-zoster virus (VZV)감염에만 이용되고있고 최근에 이들 바이러스에 의한 이차감염된 AIDS환자수의 급증으로 약물내성균주출현도 급증하고 있다. 그리고 CMV 치료제로 공인된 Foscarnet (phosphonoformic acid, sodium salt)나 Ganciclovir의 경우 독성 때문에 AIDS나 면역저하 환자에게만 치료하도록 허가되어 있고 치료 효과도 일시적일 뿐이다. 따라서 광범위 효과를 지니면서도 부작용이 적고 지속적인 치료효과를 지닌 물질의 발견이 시급하다.

바이러스는 종류에 따라 숙주 및 증식기작등이 다르기 때문에 광범위 효과를 가진 약물을 발견하기 어렵다. 유기화합물의 경우 구조가 결정되었고 치료제가 없는 바이러스질환이 많으므로 시료량이 충분할 경우 가급적 여러가지 바이러스에 대한 약효를 조사해보는 것이 바람직하다. Herpesvirus는 DNA virus임으로 적은 시료량으로 손쉽게 약효를 평가할 수 있는 RNA virus인 poliovirus type 1 (PV-1) (소아마비유발), coxackie B virus type 3 (CoxB3) (감기 및 열성질환,

간혹 무균성 수막염, 심장질환 유발), 와 vesicular stomatitis virus (VSV)를 시험항목으로 추가 하였다. PV-1과 CoxB3는 작으면서 외피가 없는 positive-single-stranded RNA 바이러스인 picornaviridae에 속하는 enterovirus속에 포함된다. 이들은 주로 구강으로 전염되며 주로 중추신 경계 질병을 유발하나 심장질환을 유발하기도 한다. 화학치료제나 예방제가 전혀 개발되어 있지 않고 백신에 의한 예방이 거의 완벽한 poliovirus (PV)를 제외한 나머지 종류의 바이러스에 대한 백신은 개발 되어있지않다. 소나 말에 수포성 구내염을 일으키는 VSV는 외피를 가진 negative single-stranded RNA virus인 rhabdoviridae에 속하며 rabies virus (광견병유발)도 이에 포함된다.

해양 생물로 부터의 항바이러스물질 발견은 최근에서야 가능해진 대량 약효검색법으로 인하여 국제경쟁력도 있다 할 수 있고 우리나라 보유자원의 생리활성물질보유정도에 대한 정보축적이란 점에서 의의가 크다 할 수 있겠다. 따라서 본 보고서에서는 herpesvirus치료제개발을 목적으로 한국해양연구소에서 분리된 해양생물 추출물질들에 대하여 HHV의 8가지 중 3가지 바이러스, 즉, HSV-1, HSV-2와 CMV에 대한 증식저해작용을 조사하였으며 추가로 PV-1, CoxB3, VSV등의 RNA virus들에 대한 약효검색을 수행하였음을 보고하려한다.

제 2 장 연구추진방법

제 1 절 연구내용

한국해양연구소에서 해양생물들로부터 분리된 물질들을 일차로 Vero세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였고, 이차로 CPE저해법을 이용하여 cytomegalovirus에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 HeLa 세포체계에서 일부시료에 대한 RNA virus 인 poliovirus, coxsackie B virus 와 vesicular stomatitis virus에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다.

제 2 절 실험재료

1. 세포

세포는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입한 Vero세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)와 HEL 299세포 (human embryonic lung fibroblast cell) (ATCC CCL 137)과 HeLa세포(human cervix epitheloid carcinoma cell) 를 사용하였다.

2. 바이러스

시험에 사용된 human herpesvirus 들은 다음과 같다.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F (ATCC VR-733)

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS (ATCC VR-734)

Cytomegalovirus (CMV) strain AD-169 (ATCC VR-538)

Cytomegalovirus (CMV) strain Davis (ATCC VR-807)

시험에 사용된 RNA virus 중 enterovirus들은 다음과 같다.

Poliovirus type 1 (PV-1) strain Brunhilde

Coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy

Rhabdovirus에 속하는 vesicular stomatitis virus (VSV) strain Indiana도 시험에 이용되었다.

3. 시험물질 및 표준약물

시험물질로는 한국해양연구소 (KORDI)에서 의뢰된 해양생물로 부터 분리된 물질들이었다. 표준약물로서 이용된 화합물들의 이름과 약칭과 제조회사 및 대상바이러스를 Table 2에 표시하였다. 그중 ACV와 AZT는 삼천리제약으로 부터 GCV는 연세대학교 의과대학 김 준명교수로부터 기증받았으며 나머지는 구매하였다. PAA와 PFA와 GCV는 증류수에 나머지는 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 사용하였다.

제 3 절 실험방법

1. 세포배양

Vero세포와 HeLa세포를 지름 10 cm petri dish에 4 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin (Gm)(Sigma)과 5%의 열처리된 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle (DME) (Gibco)배지(DME/5% FBS)에서 세포단층이 형성될 때까지 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 증식시켰다. HEL 299은 4 $\mu\text{g/ml}$ Gm과 10% FBS와 불필수 아미노산이 포함된 DME 배지에서 증식되었다. Vero와 HeLa세포는 3 -4 일, HEL 299세포는 일주일 간격으로 trypsin처리를 하여 계대하였고, HEL 299세포의 경우 계대회수가 20번이 지나면 폐기하였다.

2. 바이러스의 증식

HSV-1과 HSV-2는 Vero세포에서, CMV는 HEL 299세포에서, RNA virus들은 HeLa세포에서 증식되었다. 즉, T75-flask (배양면적 75 cm^2)에 숙주세포단층이 형성되면 배양액을 제거하였다. 바이러스를 DME/2% FBS 에 희석하여 1.5 ml 바이러스 희석액에 세포 한개마다 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)이 되도록 접종하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 배양기에서 1 시간 동안 (CMV의 경우 2 시간, RNA 바이러스의 경우 30분) 흡착시킨 후 배양액을 제거함으로써 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2% FBS 를 6 ml 첨가한 후 70%의 세포가 CPE (cytopathic effect)를 나타낼 때까지 계속 배양하였다. 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣었다. - 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 얼리고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 녹이는 작업을 세번 시행한 후 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 소량 씩 용기에 분주한 후 - 70 $^{\circ}\text{C}$ 에 바이러스 종균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 신속히 녹여 사용하였다.

3. 바이러스 역가측정

바이러스종균액의 역가를 알기위하여 1:10으로 연속희석한 후 96-well plate에 confluent하게 배양된 세포단층에 well당 100 μl 씩 접종하였다. CMV와 VZV의 경우 2 시간동안 나머지 바이러스의 경우는 1 시간동안 흡착 시킨 후 100 μl 의 배양액을 첨가하였다. HSV-1과 HSV-2의 경우

3일간, CMV의 경우 7 일간, RNA virus의 경우 2일 간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) 방법 (실험방법 10 항 참조)을 이용하여 역가를 측정하였다.

4. 항herpes simplex virus 약효검색

약효검색은 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 96-well plate에 Vero세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100 μ l씩 접종하고 1시간동안 37 °C에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 다음 MTT검색법 (실험방법, 11항 참조)으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentraion)로 결정하였다. 약효평가결과에서 약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 더해진 다음 (mock-infected) 바이러스로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리되었다. 즉, 한시간 배양 후 배지가 제거되었고 배양액에 희석된 약물이 duplicate로 첨가되었다. 3일 배양 후 MTT검색법으로 약물이 첨가된 각 well의 살아남은 세포수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC₅₀ (50% cytotoxic concentraion)로 결정하였다.

5. 항cytomegalovirus 약효검색

약물의 항 CMV 약효는 HSV와 같이 CPE 저해법으로 평가하였다. 성장이 멈춘 HEL 299세포에 희석된 바이러스를 96-well plate의 well당 2~4 CCID₅₀가 되도록 100 μ l씩 접종시키고 두시간 동안 37 °C CO₂ 배양기에서 흡착시켰다. 바이러스액을 제거하고 HSV에서와 같이 약물을 100 μ l씩 duplicate로 첨가한 후 일주일동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 세포를 고정시키고 Giemsa 염색액으로 세포를 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50%의 세포가 바이러스에 의한 CPE를 나타내지 않도록 한 약물의 농도를 EC₅₀로 산출하였다.

6. 항poliovirus 약효검색

접종량이 100 CCID₅₀로 희석된 바이러스를 96-well plate의 HeLa세포에 앞에 기술한 항 HSV-1과 HSV-2약효검색법과 같이 시행하였는데, 2 일간 배양한 다음 약효를 판정하였다.

7. 항coxsackie B virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

8. 항vesicular stomatitis virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

9. 세포독성검사

약물이 세포에 끼치는 독성을 세포성장에 주는 영향조사 (cell growth test)와 성장이 멈춘 세포를 죽이는 독성조사 (cell viability test)의 두가지 측면에서 조사할 수 있다. 실험방법 4항에 기술한 바와 같은 mock-infected 실험은 후자에 대한 조사였다.

10. MTT검색법

이 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 노란색을 띠는 MTT를 보라색을 지닌 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다.⁽⁹⁾ 배양이 끝난 Vero세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3 mg/ml로 희석된 MTT (Sigma)액을 96-well plate의 well당 50 ul씩 넣어준 후 37 °C CO₂ 배양기에서 두시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100 액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan결정들이 완전히 녹도록 하였다. Microplate reader (Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에서의 흡광도를 읽었다. A₅₄₀과 A₆₉₀의 흡광편차에서 blank값을 뺀 다음 cell control과 virus control과 비교하였다.

즉, 항바이러스효과는

$$\frac{(A_T)_{HSV} - (A_C)_{HSV}}{(A_C)_{mock} - (A_C)_{HSV}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

세포독성은

$$\frac{1 - (A_T)_{mock}}{(A_C)_{mock}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

(A_T)_{HSV}: 바이러스와 약물이 첨가된 well의 흡광도

(A_C)_{HSV}: 바이러스만 첨가된 well의 흡광도 (virus control)

(A_C)_{mock}: 배양액만이 약물이 첨가된 well의 흡광도 (cell control)

(A_T)_{mock}: 약물이 첨가된 well의 흡광도

항HSV값으로 부터 EC₅₀와 세포독성 값으로 부터 CC₅₀를 구한 후 selectivity index (SI) (CC₅₀/ EC₅₀) 를 구하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

한국해양연구소에서 해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 40개의 시료에 대한 항바이러스약효를 평가하였다. 일차로 Vero세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였고, 이차로 CPE저해법을 이용하여 cytomegalovirus에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 HeLa 세포체계에서 일부시료에 대한 RNA virus 인 poliovirus, coxsackie B virus 와 vesicular stomatitis virus에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다. 보내진 시료수와 시험된 약효검색 항목을 표 3에 표시하였고, 각 시료의 항바이러스 효과를 표 4에 요약하였다.

제 1 절 항 herpesvirus 약효검색

1. 항 herpes simplex virus 약효검색

시험이 의뢰된 모든 시료에 대하여 일차로 HSV-1 strain F와 HSV-2 strain MS와 세포독성으로서 cytocidal effect를 조사하였다. 실험방법에 기술한 바와 같이 접종량 100 CCID₅₀인 바이러스로 96-well에 배양된 Vero 세포를 감염시키고 1시간 흡착시킨 다음 시험약물을 duplicate로 첨가하였다. 매 실험마다 ACV와 Ara-C를 표준약물로서 이용하였다. 3일 배양 후 CPE 저해법으로 약물이 첨가되지 않은 virus control과 약물이 첨가된 well의 세포수를 상대적으로 비교하여 항바이러스약효를 EC₅₀값으로서 표시하였다. 또한 약물의 항바이러스약효가 약물이 지니는 독성에 의해 받는 영향을 조사하기 위하여 바이러스없이 약물만 duplicate로 첨가하여 세포독성을 함께 조사하였다. 모든 실험 과정은 항바이러스 약효와 동시에 같은 방법으로 수행되었고 약물이 첨가되지 않은 well을 cell control로 하였다. 약물이 첨가된 well에 살아남은 세포수가 1 CCID₅₀가 되는 약물의 농도를 cell control과 비교하여 조사하였다. CC₅₀값과 EC₅₀값을 비교하여 SI값을 구하였다 (CC₅₀/EC₅₀). SI가 1은 50 % 독성을 나타내는 농도와 50% 바이러스저해농도와 같음을 뜻하며, 10인 경우는 독성치의 1/10 농도에서 항바이러스약효를 나타냄을 뜻한다. 따라서 SI값이 높을수록 독성은 적고 약효가 큼을 뜻하고 개발가치가 높음을 뜻한다.

해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 모두 40개의 시료에 대한 약효를 평가하였는데, 뚜렷한 약효를 나타낸 물질은 없었다 (표 4). 한 시료에 대한 시험결과를 그림 1에 나타냈다.

2. 항 cytomegalovirus 약효검색

실험방법에서 기술한 바와 같이 CMV 질병치료제로 공인된 GCV (Cytovene)와 phosphonate 유도체인 PFA disodium salt (Foscarnet, Foscavir)를 표준약물로 사용하였다. 바이러스에 감

염된 HEL 299세포에 일주일간 약물을 처리한 후 약물들의 CMV증식 억제효과를 CPE 저해법으로 평가하여 EC₅₀값으로서 표시하였다. 시험균주는 Davis와 AD-169을 사용하였고 HEL세포에 대한 약물의 독성은 따로 검색하지 않았다. 총 17 개의 시료를 검색하였는데, 독성이 적으면서도 뚜렷한 약효를 나타낸 물질은 없었다(표 4). 한 시료에 대한 시험결과를 그림 2에 나타냈다.

제 2 절 항 RNA virus

1. 항 enterovirus 약효검색

실험방법에 기술된 바와 같이 PV-1 strain Brunhilde와 CoxB3 strain Nancy에 대한 항바이러스약효를 HeLa세포체계에서 검색하였다. 약물의 cytocidal effect도 함께 조사되었으며 표준약물로는 ribavirin을 이용하였다. 모두 40개 시료에 대한 약효검색이 수행되었으며 뚜렷한 효과를 나타내는 화합물은 발견되지 않았다(표4). 시험결과 양식을 그림 3에 표시하였다.

2. 항 vesicular stomatitis virus

항enterovirus 약효검색법과 같은 방법으로 HeLa세포체계에서 동시에 수행되었다. 표준약물은 ribavirin이었으며 모두 40개 시료에 대한 약효검색이 수행되었으며 뚜렷한 효과를 나타내는 화합물은 발견되지 않았다(표4). 시험결과 양식을 그림 3에 표시하였다.

Table 1. Human viruses of the family Hepresviridae

Human herpes	Common name	Abbreviation	Disease
type 1	Herpes simplex type 1	HSV-1	herpes labialis, encephalitis, keratitis, eczema herpeticum
type 2	Herpes simplex type 2	HSV-2	genital and anal lesion, neonatal herpes
type 3	Varicella-zoster	VZV	chickenpox, shingles
type 4	Epstein-Barr	EBV	mononucleosis, Burkitt's lymphoma, nasopharygeal carcinoma, lymphopro- liferative disease in immuno- suppressed patients
type 5	Cytomegalovirus	CMV	major causes of morbidity and mortality among immunocompromized patients (encephalitis, retinitis, pneumonitis, CNS disease)
type 6	Human herpesvirus type 6	HHV-6	exsanthem subitum, roseola infantum,
type 7	Human herpesvirus type 7	HHV-7	not well known
type 8	Human herpesvirus type 8	HHV-8	Burkitt's lymphoma?

Table 2. List of standard compounds

Abbr.	Compound	Manufacturer	Test virus
ACV	acyclovir 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine	Samchunli	HSV-1, HSV-2 VZV
Ara-C	cytosine- β -D-arabinofuranoside	Sigma	HSV-1, HSV-2
GCV	ganciclovir or DHPG 9-(1,3-dihydroxy-2-proxymethyl)guanine	Synthex	CMV
PFA	phosphonoformic acid, trisodium salt foscarnet	Sigma	CMV
Rib	Ribavirin	ICN	PV-1, CoxB3, VSV

Table 3. Numbers of the compounds tested

Family	Virus	Strain	Number
Herpesviridae	Herpes simplex virus type 1	F	34
	Herpes simplex virus type 2	MS	34
		Davis	40
	Cytomegalovirus	AD-169	40
Picornaviridae	Poliovirus type 1	Brunhilde	40
	Coxsackie B virus type 3	Nancy	40
Rhabdoviridae	Vesicular stomatitis virus	Indiana Lab	40

Table 4. Summary of antiviral activity of the tested and the standard compounds

(ug/ml)

Compound	Vero cell				HEL cell				HeLa cell				
	CC50		EC50		CC50		EC50		CC50		EC50		
	CS*	CC**	HSV-1	HSV-2	CS	CC	CMV		CS	CC	PV-1	CoxB3	VSV
			F	MS			AD-169	Davis			BH	Nancy	India
94K-4-A							>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-4-B							>100	>100		>100	>100	>100	>100
1A							3.7	>3.7		18	>18	>18	>18
2D							>3.7	>3.7		15	>15	>15	>15
4B							<3.7	NC		10	>10	>10	>10
5C							>3.7	>3.7		32	>32	>32	>32
94G-1-C		>100	>100	>100			33.3	58		>100	>100	>100	>100
94G-1-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94G-4-C		>100	>100	>100			100	69		>100	>100	>100	>100
94G-4-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94G-9A-C		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94G-9A-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94G-9B-C		>100	>100	>100			>100	48		>100	>100	>100	>100
94G-9B-M		>100	>100	>100			48	>100		>100	>100	>100	>100
94G-17-C		>100	>100	>100			42	33		>100	>100	>100	>100
94G-17-M		>100	>100	>100			>100	100		>100	>100	>100	>100
94K-6-C		>100	>100	>100			>100	33		>100	>100	>100	>100
94K-6-M		>100	>100	>100			>100	80		>100	>100	>100	>100
94K-7-C		>100	>100	>100			>33	23		>100	>100	>100	>100
94K-7-M		68.5	>68.5	>68.5			>11	>11		>100	>100	>100	>100
94K-8-C		>100	>100	>100			>33	11		15.4	>15.4	>15.4	>15.4
94K-8-M		>100	>100	>100			>100	62		>100	>100	>100	>100

* CS: cytostatic effect

** CC: Cytocidal effect

Table. 4 continued

Compound	Vero cell				HEL cell				HeLa cell				
	CC50		EC50		CC50		EC50		CC50		EC50		
	CS	CC	HSV-1	HSV-2	CS	CC	CMV		CS	CC	PV-1	CoxB3	VSV
			F	MS			AD-169	Davis			BH	Nancy	India
94K-14-C		>100	>100	>100			33	>100		>100	>100	>100	>100
94K-14-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-18-C		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-18-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-20-C		43.7	>43.7	>43.7			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-20-M		>100	>100	>100			>100	80		>100	>100	>100	>100
94K-23-C		>100	>100	>100			66	44		>100	>100	>100	>100
94K-23-M		>100	>100	>100			>100	>100		>100	>100	>100	>100
94K-25-C		>100	>100	>100			60	44		>100	>100	>100	>100
94K-25-M		>100	>100	>100			<3.7	<3.7		>100	>100	>100	>100
Shin-1	19.2	18.4	>18.4	>18.4			33.3	33.3	18.1	18	>18	>18	>18
Shin-2	>300	>300	>300	>300			>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Shin-3	19.1	45.6	>45.6	>45.6			CT	CT	43.5	60	>60	>60	>60
Shin-4	>300	>300	>300	>300			100	208	>300	>300	>300	>300	>300
Shin-5	19.2	>300	>300	>300			137	151	18.1	>300	>300	>300	>300
Shin-6	>300	>300	>300	>300			208	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Shin-7	13.6	25.1	>25.1	>25.1			<11.1	<11.1	11.8	25.1	>25.1	>25.1	>25.1
Shin-8	58.6	168	>168	>168			33.3	33.3	73.1	198	>198	>198	>198
ACV	>100	>100	0.3	4.2					>100				
Ara-C	0.45	4.2	0.2	3.2					>100				
GCV	>100						1.1	0.6	>100				
Foscarnet	>100						54.4	54.2	>100				
Ribavir.	>100								>100	>100	65.0	>100	20.0

KRICT
Pharmaceutical Screening Center

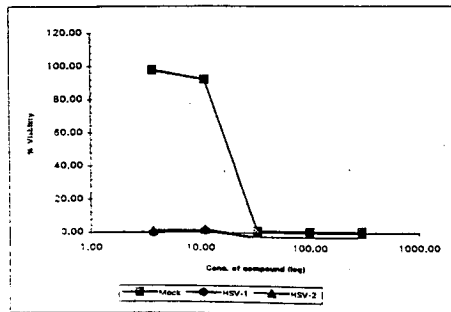
Exp.No	95H29	Antiviral Evaluation Report	Date	28-Aug-95
Code	shin-1		Source	KORDI-신중헌

Virus information			Host cell information		Assay information	
Virus	HSV-1	HSV-2	Cell	Vero (CCL81)	Assay	CPE / MTT
Strain	F	MS	Passage	22	Day	3d
Batch No	I6	H7	Remark		Plate No	95H29A
Inoc. size	85	79			실험자	이종교, 피미경, 김혜수
Dilution	50.00	83.33			책임자	이종교

Mock infected cells							
µg/ml	OD values		Mean	Std	CC OD	% Viability	Remark
300.00	0.02	0.02	0.02	0.00		0.96	Max. via 97.56
100.00	0.01	0.02	0.01	0.00		0.79	Min. via 0.79
33.33	0.02	0.02	0.02	0.00	1.82	0.88	Max. std 0.01
11.11	1.69	1.67	1.68	0.01		91.97	Min. std 0.00
3.70	1.79	1.77	1.78	0.01		97.56	

HSV-1 infected cells							
µg/ml	OD values		Mean	Std	VC OD	% Viability	Remark
300.00	0.02	0.02	0.02	0.00		-3.43	Max. via 1.29
100.00	0.01	0.02	0.01	0.00		-3.55	Min. via -3.55
33.33	0.01	0.02	0.01	0.00	0.08	-3.55	Max. std 0.00
11.11	0.10	0.10	0.10	0.00		1.29	Min. std 0.00
3.70	0.07	0.07	0.07	0.00		-0.29	

HSV-2 infected cells							
µg/ml	OD values		Mean	Std	VC OD	% Viability	Remark
300.00	0.02	0.02	0.02	0.00		-2.84	Max. via 1.71
100.00	0.02	0.01	0.01	0.00		-2.99	Min. via -2.99
33.33	0.02	0.01	0.01	0.00	0.07	-2.99	Max. std 0.07
11.11	0.10	0.10	0.10	0.00		1.71	Min. std 0.00
3.70	0.13	0.04	0.09	0.07		1.17	



Result

Antiviral activity			
Virus	Strain	EC50	SI
HSV-1	F	>18.4	<1
HSV-2	MS	>18.4	<1
Cytotoxicity activity			
CC50	18.4		
Remarks			
Suggestions			

Fig. 1. Anti-herpes simplex virus activity report

KRICT Pharmaceutical Screening Center Anticytomegalovirus Evaluation Report														
Rep. Date		11-Sep-95				Rep. to		KORDI-신종현						
Exp. No		95CV13				Exp. Date		1-Sep-95						
Virus		Human cytomegalovirus				Host Cell		HEL299						
Strain		AD-169		Davis		Inoculum size		CCID50/well						
Incubation		7d				Assay		CPE inhibition/Giemsa stain						
Sample Code	Conc. $\mu\text{g}/\text{ml}$	Cytotoxicity		AD-169				Cytotoxicity		Davis				IS
		Observed		Net CPE %	% Via.	Observed		Net CPE %	% Via.					
shin-1	300.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	AD :2 Davis :0.8
	100.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	
	33.33			50	50	30.00	50.00			20	20	50.00	50.00	
	11.11			70	70	30.00	30.00			40	40	0.0	0.00	
EC50				33.3						33.3				
shin-2	300.00			70	80	30.00	20.00			40	40	0.00	0.00	AD :2 Davis :0.8
	100.00			100	100	0.00	0.00			40	40	0.00	0.00	
	33.33			100	100	0.00	0.00			40	40	0.0	0.0	
	11.11			100	100	0.00	0.00			40	40	0.00	0.00	
EC50				>300						>300				
shin-3	300.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	AD :2 Davis :0.8
	100.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	
	33.33	++++	++++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	
	11.11	+++	+++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	
EC50				CT don't						CT don't				
shin-4	300.00	+	+	30	30	70.00	70.00	+	+	10	10	75.00	75.00	AD :2 Davis :0.8
	100.00			50	50	50.00	50.00			40	40	0.00	0.00	
	33.33			60	60	40.00	40.00			40	40	0.00	0.00	
	11.11			100	100	0.00	0.00			40	40	0.00	0.00	
EC50				100						208				
shin-5	300.00			20	30	80.00	70.00			10	5	75.00	87.50	AD :2 Davis :0.8
	100.00			60	60	40.00	40.00			30	25	25.00	37.50	
	33.33			70	70	30.00	30.00			40	40	0.00	0.00	
	11.11			100	100	0.00	0.00			40	30	0.00	25.00	
EC50				137						151				
shin-6	300.00	+	+	40	40	60.00	60.00			30	30	25.0	25.00	AD :2 Davis :0.8
	100.00			70	70	30.00	30.00			40	40	0.00	0.00	
	33.33			70	70	30.00	30.00			40	40	0.00	0.00	
	11.11			100	100	0.00	0.00			40	40	0.00	0.00	
EC50				208						>300				
shin-7	300.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	AD :2 Davis :0.8
	100.00	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	
	33.33	++++	++++	CT	CT	#####	#####	++++	++++	CT	CT	#####	#####	
	11.11	+	+	30	30	70.00	70.00	++	++	5	5	87.50	87.50	
EC50				<11.1						<11.1				

Fig. 2. Anti-cytomegalovirus activity report

KRICT										
Pharmaceutical Screening Center										
Anti-Polio Evaluation Report										
Exp. No		95PC13			Date		28-Aug-95			
Code		shin-1			Source		KORDI			
Virus information				Host cell information			Assay information			
Virus	PV-1	Coxsackie B3		VSV	Cell line	HeLa		Assay	CPE/MTT	
Strain	BH	Nancy			Passage	16		Day	2d	
Batch No	C2	C5		G2	Remark			Plate No.	95PC13B	
Inoc. size	197	>1000		198				실험자	이종교, 김해수	
Dilution	14615	76		10556				책임자	이종교	
Mock infected cells										
Conc.	OD value			Mean	Std	Control	% Viability	Remark		
300.00	0.013	0.014		0.014	0.001		0.80			
100.00	0.013	0.014		0.014	0.001		0.80			
33.33	0.014	0.015		0.015	0.001	1.69	0.86			
11.11	1.43	1.574		1.502	0.102		88.64			
3.70	NT	NT		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!			
PV-1 infected cells										
Conc.	OD value			Mean	Std	Control	% Viability	Remark		
300.00	0.015	0.015		0.015	0.000		-0.30			
100.00	0.015	0.014		0.015	0.001		-0.33			
33.33	0.019	0.015		0.017	0.003	0.02	-0.18			
11.11	0.017	0.019		0.018	0.001		-0.12			
3.70	NT	NT		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!			
Cox B3 infected cells										
Conc.	OD value			Mean	Std	Control	% Viability	Remark		
300.00	0.014	0.014		0.014	0.000		-0.06			
100.00	0.014	0.013		0.014	0.001		-0.09			
33.33	0.015	0.014		0.015	0.001	0.02	-0.03			
11.11	0.016	0.017		0.017	0.001		0.09			
3.70	NT	NT		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!			
VSV infected cells										
Conc.	OD value			Mean	Std	Control	% Viability	Remark		
300.00	0.015	0.013		0.014	0.001		-0.06			
100.00	0.014	0.013		0.014	0.001		-0.09			
33.33	0.016	0.015		0.016	0.001	0.02	0.03			
11.11	0.019	0.015		0.017	0.003		0.12			
3.70	NT	NT		#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!			
Result										
Cytotoxicity activity		CC50		Antiviral activity		EC50		EC90		
Cytocidal effect		18		PV-1		>18		>18		
				Cox B3		>18		>18		
				VSV		>18		>18		

Fig. 3. Anti-poliovirus, coxsackie B virus and vesicular stomatitis virus activity report

제 4 장 결 론

한국해양연구소에서 해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 40개의 시료에 대한 항바이러스약효를 평가하였다. 모든 시료에 대하여 Vero세포체계에서 HSV-1과 HSV-2에 대한 in vitro 항바이러스 효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였다. CPE저해법을 이용한 CMV에 대한 약효검색을 수행하였으며, 또한 일부 시료에 대한 HeLa 세포체계에서 RNA virus 인 PV-1, CoxB3와 VSV에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행되었다. 아직 특정 바이러스에 대하여 뚜렷한 약효를 나타내는 것은 아직 발견되지 않았다. 신약을 개발하기 위하여 앞으로도 많은 시료에 대한 지속적인 약효검색이 요구된다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Prusoff WH, Lin T-S, Zucker M: Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 6:311-328, 1986.
2. Lee, Chong K: Present trends in the development of antiviral agents. *Pharma News* 2(1): 2-21, 1992.
3. De Clercq E: New acquisitions in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52:69-99, 1990.
4. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH: Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:748-752, 1990.
5. Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, Frenkel N: Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 65:6260-6265, 1991.
6. Mills J, Masur H: AIDS-related infections. *Scient American*:32-39, August, 1990.
7. Nelson JA, Ghazal P, Wiley CA: Role of opportunistic viral infections in AIDS. *AIDS* 4:1-10, 1990.
8. Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, Baseler M, Gallo RC : Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349:533-535, 1991.
9. Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E: Rapid and automated tetrazolium- based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. *J Virol Methods* 20:309-321, 1988.