

97-NZ-01-01-A-15
(BSPN 97363-00-1123-4)

해면동물로부터 생리활성물질 추출연구

A Study on the Isolation of Bioactive Substances
from Sponges

한국해양연구소

과학기술부



제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 추천연구원 창의적연구진흥사업인 “해면동물로부터 생리활성물질 추출 연구”의 보고서로 제출합니다

1998. 12. 31

주관연구기관: 한국해양연구소

연구책임자 : 신 종 헌

연 구 원 : 서 영 완

조 기 용

노 정 태

이 희 승

정 호 성

조 연 정

백 은 주

이 동 익

최 영 희



요 약 문

I. 계 목

해면동물로부터 생리활성물질 추출연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

해면동물은 모든 해양생물 중에서 생리활성 신물질이 가장 빈번히 추출된 생물로서 지난 수 십 년간 해양천연물 연구의 중요한 연구대상으로 주목받고 있다. 무수한 생리활성물질이 이들로부터 분리되었고 여러 종의 선도물질은 현재 신의약품으로서 개발 중에 있으며 가까운 시일에 상업화가 성공할 것으로 기대된다. 또한 독특하고 강력한 생리활성으로 인하여 다수의 해면유래 천연물이 약학이나 생화학적 연구에 이용되고 있다. 선진국에서는 생의학적인 목적을 위하여 해면동물의 대량양식과 이에 의한 물질의 대량추출을 시도하고 있다. 최근에 보고되는 해양천연물화학이나 관련분야의 연구결과 의 거의 절반이 해면동물의 천연물에 관한 것이다. 학문적, 산업적 연구가치가 무한한 해면동물은 미래에도 오랜 기간 천연물에 대한 기초 및 응용연구의 가장 중요한 연구대 상으로 기대되고 있다. 그러나 근해에 무수한 해면동물이 서식함에도 불구하고 이들의 천연물은 국내에서 거의 연구가 되지 못하고 있다.

본 연구의 궁극적인 목표는 해면동물로부터 강력하고 독특한 생리활성을 가진 신물 질을 개발하는 것이며 이 과정에서 해양천연물 연구의 전 과정에 걸쳐 기술의 축적을 시도하는 것이다. 이를 위하여 이차대사물질의 분리와 구조 결정 및 천연물과 합성유도 체에 대한 다양한 생리활성의 측정을 시도하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

우리 나라 남해안과 동해안의 여러 지역으로부터 해면동물을 채집하였으며 다수의 열대 및 한대해역의 시료도 현장채집과 국제공동연구에 의하여 확보하였다. 생리활성도 와 화학적 분석에 의하여 연구대상 시료를 선정하였으며 다양한 분리기술을 이용하여 이차대사물질을 분리하였다. 정제된 천연물은 유기화학과 분광학적 방법을 이용하여 구 조를 결정하였으며 신물질에 대하여 다양한 생리활성을 측정하였다.

IV. 연구결과

1. 거문도, 백도, 울릉도, 제주도 등 우리 나라 연안에 위치한 여러 도서의 근해에서 67 종의 해면시료를 채집하였다. 또한 국제협력을 통하여 열대태평양의 Guam과 Pohnpei 인근의 해면 18 종을 획득하였고 남극연안에서도 다수의 시료를 채집하는 등 합계 470 kg 이상의 해면시료를 확보하였다.

2. 시료의 조추출물에 대한 항미생물, 세포독성, 효소저해, DNA-분해, brine-shrimp 독성 등의 생리활성과 화학적 분석의 결과를 종합하여 6종의 시료를 일차적인 연구대상으로 선정하였다.

3. 선정된 시료로부터 유기물질을 추출하여 다양한 크로마토그래피 기법을 이용하여 29 종의 신물질을 포함한 42 종의 천연물을 분리하였다. 정제된 물질의 구조는 전합성 등 화학적 방법과 다차원 핵자기 공명을 비롯한 분광학적 분석의 결과를 종합하여 구조를 결정하였다. 이들은 sesquiterpenoids, epidioxysteroids, polyacetylenes, acetylenic glyceryl ethers, bis(indole)imidazoles, bisguanidine alkaloids, indolizidine alkaloids, bromotyrosine-derived alkaloids, biphenylic alkaloids 등 구조적으로 매우 다양한 계열의 물질들이 망라되어 있었다.

4. 신물질에 대한 다양한 생리활성 검색 결과 상당수의 물질이 항미생물, 세포독성, RNA 분해와 PLA₂, Na⁺/K⁺-ATPase, reverse transcriptase 등의 효소에 대한 저해활성을 갖고 있음을 확인하였다. 현재 이들은 생체내의 활성과 기작에 대한 연구가 전문연구기관에서 진행중이다.

V. 결론 및 토의

본 연구의 결과는 우리 나라 근해와 열대에 서식하는 해면동물의 생의학적 가치와 국내에서의 독자적인 해양천연물연구의 성공가능성을 입증하였다. 또한 본 연구에 의하여 향후의 본격적인 해양천연물에 기초한 신물질 개발연구를 위한 기초를 확립하였다.

본 연구과정에서 개발된 여러 단위기술 특히 유기물질의 분리와 구조결정, 생리활성 측정 등의 기술은 화학, 생의학, 화학생태학 등 여러 관련분야의 연구에 직접 이용될 것이며 해면동물의 화학적 성분에 대한 정보 또한 관련분야의 연구에 활용될 것이다. 본 연구에서 분리된 생리활성 신물질은 신물질 개발을 위한 소재로 활용될 것이며 특히 이러한 목적을 위하여 수 종의 천연물과 그 유도체는 유기화학적 방법에 의하여 합성될 계획이다.

SUMMARY

I. Title

A Study on the Isolation of Bioactive Substances from Sponges

II. Objective and Significance of the Study

Sponges (phylum Porifera) have been widely recognized as the most prolific sources of structurally unique and biologically active marine natural products. Since the chemical investigation of marine organisms has begun a few decades ago, sponges have been regarded as one of the most important target organisms. Numerous bioactive metabolites have been isolated from these animals. Several compounds are currently in the clinical trials and expected to be commercially available in near future. In addition, sponge metabolites possessing unique and unusual bioactivity are frequently used as probes for pharmacological and biochemical researches. Leading countries are even pursuing the large-scale cultivation of sponges for biomedical purposes. Consequently, almost half of recent publications on marine natural products chemistry as well as related chemical and biomedical sciences are on the metabolites of these animals. Due to the tremendous academical and industrial potentials of their metabolites, sponges are expected to be among the most important organisms for both basic and applied biomedical researches for a long time in the future. Despite the great abundance of these animals, however, sponges of Korean waters have been virtually neglected for biochemical investigation.

The ultimate objective of this research is the development of novel natural products possessing potent and/or unique bioactivity from sponges. In the meanwhile, technical progress is established on the whole processes of marine natural products chemistry. To achieve this goal, secondary metabolites have been systematically isolated and structurally elucidated. In addition, diverse bioactivities have been tested for natural and semi-synthetic sponge metabolites.

III. Contents and Scope of the Study

Sponges have been collected from several locations of the South and East Sea, Korea. In addition, tropical and cold-water specimens have been obtained either directly or through collaboration with foreign institutions. Target specimens have been selected by screening using bioactivity tests and chemical analysis. Secondary metabolites have been isolated from selected samples by utilizing various chromatographic techniques guided by bioactivity. Structures of natural products have been determined by combined chemical and spectral methods. Novel natural products have been extensively tested for bioactivity.

IV. Results of the Study

1. Sixty-seven species of sponges have been collected from the offshore of Baekdo, Geomundo, Jaejudo, and Ulleungdo by skin-SCUBA diving. Eighteen species of these animals from Guam and Pohnpei of tropical Pacific have been collected through international collaboration. In addition, a few specimens have been collected from Antarctica. In total, specimens of more than 470 kg have been obtained for chemical analysis.

2. Based upon the results of bioactivity tests including antimicrobial, cytotoxic, enzyme-inhibitory, and DNA-cleaving activities as well as brine-shrimp toxicity and chemical analysis of the crude extracts, six species of sponges have been selected as primary target specimens.

3. Forty-two secondary metabolites including twenty-nine novel compounds have been isolated from the selected animals by extraction and various chromatographic methods. Structures of these compounds have been determined by combined chemical and spectral methods in particular utilizing multidimensional NMR techniques and total synthesis. Novel compounds belong to diverse structural classes such as sesquiterpenoids, epidioxysteroids, polyacetylenes, acetylenic glyceryl enol-ethers, bis(indole)imidazoles, bisguanidine and indolizidine alkaloids, bromotyrosine-derived alkaloids, and biphenyl alkaloids.

4. Extensive bioactivity tests revealed that several of novel compounds possessed potent and diverse bioactivities such as antimicrobial, cytotoxic, RNA-cleaving activities as well as inhibitory activity against PLA_2 , Na^+/K^+ ATPase, and reverse transcriptase(RT). Currently several compounds are

investigated in research institutions for *in vivo* activity and their mechanisms of action.

V. Conclusion and Discussion

This research has unambiguously demonstrated the biomedical potential of sponges from both Korean and tropical waters. In addition, it has successfully proved the possibility of independent and qualified research on marine natural products in Korea. This research has provided a solid foundation for extensive chemical investigation of marine organisms and development of marine-derived drugs.

The techniques developed during this study particularly those for isolation and structure elucidation of organic compounds and bioactivity test will be utilized in research on many related fields including chemistry, biochemistry, biomedical sciences, and chemical ecology. Biochemical information on sponges obtained by this study will be also available for similar studies. Novel and bioactive metabolites isolated from sponges will be further studied for development of new and potential drugs. In particular, some natural products and their analogues will be synthesized for this purpose.



목 차

요약문 (국문)	3
요약문 (영문)	5
그림목차	13
표목차	19
제 1 장 서론	21
제 1 절 연구개발의 필요성	23
제 2 절 연구의 목표 및 범위	25
제 2 장 국내외 기술개발현황	27
제 1 절 해양천연물 연구의 일반적인 현황	29
1. 연구의 발전과정 및 현황	29
2. 미래의 연구방향	32
3. 주요 국가의 연구 현황	34
4. 국내의 연구개발 동향	38
제 2 절 해면동물의 천연물	40
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	49
제 1 절 일반적인 연구방법	51
제 2 절 해면 <i>Petrosia</i> sp.의 대사물질	52
1. 서론	52
2. Petrosiacetylenes의 분리와 구조결정	56
3. Petroraspailynes와 petrynol의 분리와 구조결정	62
4. <i>Petrosia</i> sp.로부터 분리된 천연물의 생리활성	69
5. 실험방법	70
제 3 절 해면 <i>Tethya</i> sp.의 대사물질	148
1. 서론	148
2. Epidioxysteroids의 분리, 구조결정 및 생리활성	148
3. 실험방법	156
제 4 절 해면 <i>Spongosorites genitrix</i> 의 대사물질	180
1. 서론	180
2. Bis(indole)imidazoles의 분리, 구조결정 및 생리활성	181
3. 실험방법	186
제 5 절 해면 <i>Stelletta</i> sp.의 대사물질	210
1. 서론	210
2. Alkaloids의 분리, 구조결정 및 생리활성	212

3. 실험방법	220
제 6 절 해면 <i>Dysidea</i> sp.의 대사물질	236
1. 서론	236
2. Sesquiterpenoids의 분리, 구조결정 및 생리활성	238
3. 실험방법	248
제 7 절 해면 <i>Aplysinella rhax</i> 의 대사물질	285
1. 서론	285
2. Bromotyrosine alkaloids의 분리 및 구조결정	289
3. Biphenyl alkaloids의 분리 및 구조결정	297
4. 실험방법	298
제 8 절 결론	308
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	309
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	315
제 6 장 참고문헌	319
부 록 : 발표논문	329

Contents

Summary (Korean)	3
Summary (English)	5
List of Figures	13
List of Tables	19
Chapter 1. Introduction	21
Section 1. Importance of the Study	23
Section 2. Objective and Scope of the Study	25
Chapter 2. Research Status in Korea and Foreign Countries	27
Section 1. General Status of the Research in Marine Natural Products	29
1. Progress and Current Status of the Research	29
2. Direction of the Research in the Future	32
3. Research Status in Foreign Countries	34
4. Research Status in Korea	38
Section 2. Natural Products of Sponges	40
Chapter 3. Results of the Study	49
Section 1. General Experimental Procedures	51
Section 2. Metabolites of the Sponge <i>Petrosia</i> sp.	52
1. Introduction	52
2. Isolation and Structure Determination of Petrosiacetylenes	56
3. Isolation and Structure Determination of Petroraspailynes and Petrynol	62
4. Bioactivity of the Metabolites from <i>Petrosia</i> sp.	69
5. Experimental	70
Section 3. Metabolites of the Sponge <i>Tethya</i> sp.	148
1. Introduction	148
2. Isolation, Structure Determination, and Bioactivity of Epidioxysteroids	148
3. Experimental	156
Section 4. Metabolites of the Sponge <i>Spongosorites genitrix</i>	180
1. Introduction	180
2. Isolation, Structure Determination, and Bioactivity of Bis(indole)imidazoles	181
3. Experimental	186

Section 5. Metabolites of the Sponge <i>Stelletta</i> sp.	210
1. Introduction	210
2. Isolation, Structure Determination, and Bioactivity of Alkaloids ...	212
3. Experimental	220
Section 6. Metabolites of the Sponge <i>Dysidea</i> sp.	236
1. Introduction	236
2. Isolation, Structure Determination, and Bioactivity of Sesquiterpenoids	238
3. Experimental	248
Section 7. Metabolites of the Sponge <i>Aplysinella rhax</i>	285
1. Introduction	285
2. Isolation and Structure Determination of Bromotyrosine Alkaloids	289
3. Isolation and Structure Determination of Biphenyl Alkaloids	297
4. Experimental	298
Section 8. Conclusion	308
Chapter 4. Achievement of the Study	309
Chapter 5. Application of the Results of the Study	315
Chapter 6. References	319
Appendix : Published Results	329

List of Figures

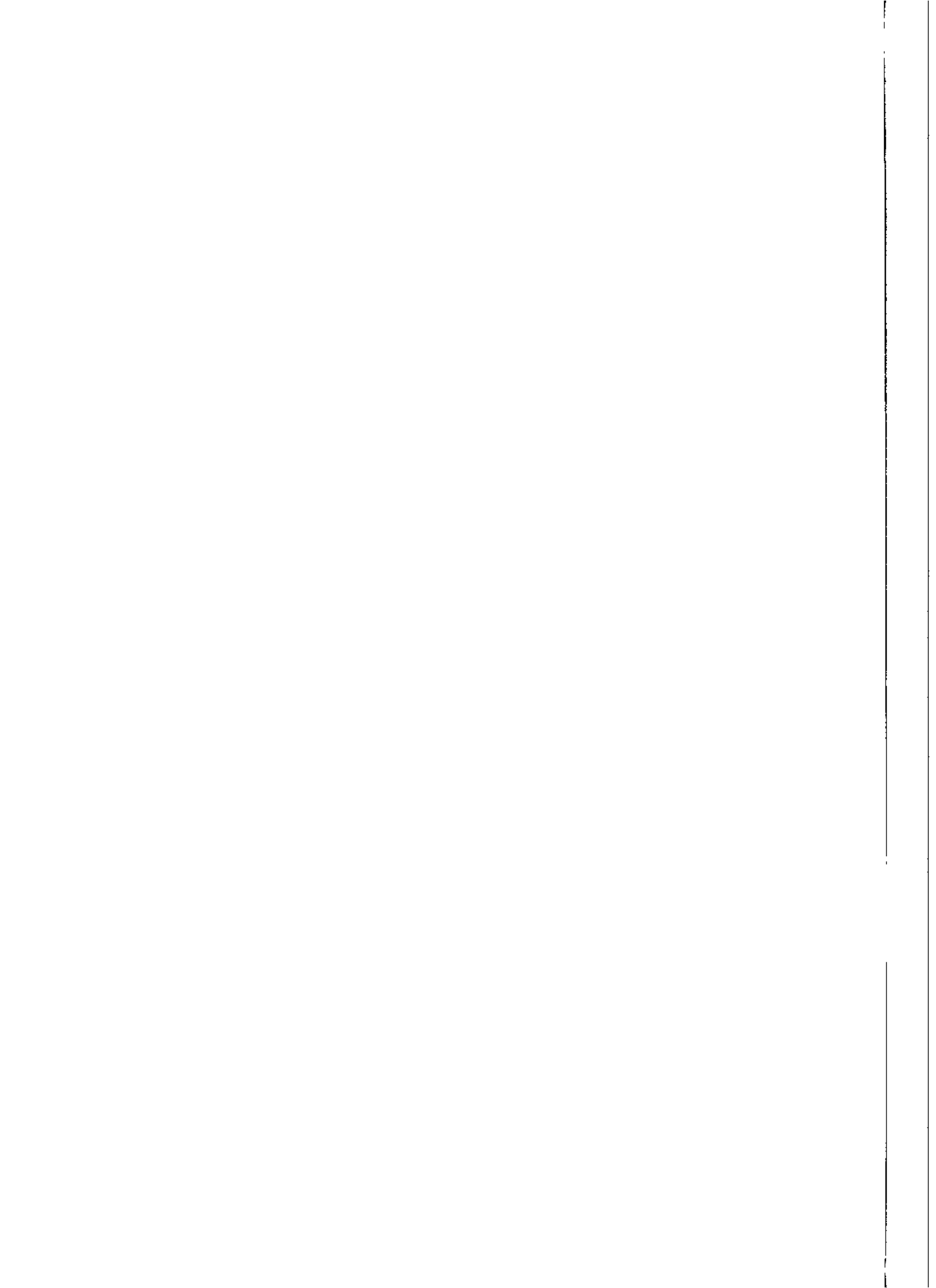
Fig. 2-1. Phyletic distribution of marine natural products.	41
Fig. 2-2. Distribution of sponge metabolites by structural classes.	42
Fig. 2-3. Bioactive metabolites isolated from sponges.	44
Fig. 3-1. Metabolites of sponges of the genus <i>Petrosia</i>	53
Fig. 3-2. Structures of petrosiacetylenes A-D and synthetic derivatives.	55
Fig. 3-3. Structures of acetylenic enol ethers of glycerol and petrynol.	57
Fig. 3-4. HRFABMS spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	84
Fig. 3-5. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	85
Fig. 3-6. DEPT spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	86
Fig. 3-7. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	87
Fig. 3-8. Proton COSY spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	88
Fig. 3-9. HMQC spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).	89
Fig. 3-10. HRFABMS spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-O).	90
Fig. 3-11. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-O).	91
Fig. 3-12. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-O).	92
Fig. 3-13. Proton COSY spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-O).	93
Fig. 3-14. HMQC spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-O).	94
Fig. 3-15. HROCIMS spectrum of petrosiacetylene C(95B-8-N).	95
Fig. 3-16. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene C(95B-8-N).	96
Fig. 3-17. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene C(95B-8-N).	97
Fig. 3-18. HRFABMS spectrum of petrosiacetylene D(95B-8-P).	98
Fig. 3-19. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene D(95B-8-P).	99
Fig. 3-20. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene D(95B-8-P).	100
Fig. 3-21. HRFABMS spectrum of compound 95B-8-HS.	101
Fig. 3-22. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HS.	102
Fig. 3-23. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HR.	103
Fig. 3-24. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HX.	104
Fig. 3-25. Carbon NMR spectrum of raspaillyne B1(95B-8-E).	105
Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of raspaillyne B1(95B-8-E).	106
Fig. 3-27. Proton COSY spectrum of raspaillyne B1(95B-8-E).	107
Fig. 3-28. HMQC spectrum of raspaillyne B1(95B-8-E).	108
Fig. 3-29. HMBC spectrum of raspaillyne B1(95B-8-E).	109

Fig. 3-30. Proton NMR spectrum of raspaillyne B2(95B-8-D),	110
Fig. 3-31. Carbon NMR spectrum of raspaillyne B2(95B-8-D),	111
Fig. 3-32. Proton NMR spectrum of isoraspaillyne B(95B-8-F),	112
Fig. 3-33. Carbon NMR spectrum of isoraspaillyne B(95B-8-F),	113
Fig. 3-34. Proton NMR spectrum of isoraspaillyne B1(95B-8-U),	114
Fig. 3-35. Carbon NMR spectrum of isoraspaillyne B1(95B-8-U),	115
Fig. 3-36. HRMS spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	116
Fig. 3-37. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	117
Fig. 3-38. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	118
Fig. 3-39. Proton COSY spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	119
Fig. 3-40. HMQC spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	120
Fig. 3-41. HMBC spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C),	121
Fig. 3-42. Proton NMR spectrum of perhydropetroraspaillyne A1,	122
Fig. 3-43. Proton NMR spectrum of acetylated perhydro- petroraspaillyne A1,	123
Fig. 3-44. HRMS spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L),	124
Fig. 3-45. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L),	125
Fig. 3-46. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L),	126
Fig. 3-47. HRMS spectrum of petroraspaillyne A3(95B-8-K),	127
Fig. 3-48. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A3(95B-8-K),	128
Fig. 3-49. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne A3(95B-8-K),	129
Fig. 3-50. HRMS spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	130
Fig. 3-51. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	131
Fig. 3-52. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	132
Fig. 3-53. Proton COSY spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	133
Fig. 3-54. HMQC spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	134
Fig. 3-55. HMBC spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S),	135
Fig. 3-56. HRMS spectrum of petroraspaillyne B2(95B-8-T),	136
Fig. 3-57. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B2(95B-8-T),	137
Fig. 3-58. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B2(95B-8-T),	138
Fig. 3-59. HRMS spectrum of petroraspaillyne B3(95B-8-G),	139
Fig. 3-60. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B3(95B-8-G),	140
Fig. 3-61. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B3(95B-8-G),	141
Fig. 3-62. HRMS spectrum of petryinol(95B-8-A),	142
Fig. 3-63. Carbon NMR spectrum of petryinol(95B-8-A),	143
Fig. 3-64. Proton NMR spectrum of petryinol(95B-8-A),	144

Fig. 3-65. Proton COSY spectrum of petrynol(95B-8-A).	145
Fig. 3-66. HMQC spectrum of petrynol(95B-8-A).	146
Fig. 3-67. HMBC spectrum of petrynol(95B-8-A).	147
Fig. 3-68. Structures of steroids isolated from the sponge <i>Tethya</i> sp.	149
Fig. 3-69. HRMS spectrum of compound 96J-32-A.	161
Fig. 3-70. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-A.	162
Fig. 3-71. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-A.	163
Fig. 3-72. Proton COSY spectrum of compound 96J-32-A.	164
Fig. 3-73. HMQC spectrum of compound 96J-32-A.	165
Fig. 3-74. HMBC spectrum of compound 96J-32-A.	166
Fig. 3-75. HRMS spectrum of compound 96J-32-B.	167
Fig. 3-76. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-B.	168
Fig. 3-77. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-B.	169
Fig. 3-78. HRMS spectrum of compound 96J-32-C.	170
Fig. 3-79. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-C.	171
Fig. 3-80. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-C.	172
Fig. 3-81. HRMS spectrum of compound 96J-32-D.	173
Fig. 3-82. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-D.	174
Fig. 3-83. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-D.	175
Fig. 3-84. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-E.	176
Fig. 3-85. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-E.	177
Fig. 3-86. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-F.	178
Fig. 3-87. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-F.	179
Fig. 3-88. Structures of the Topsentin alkaloids from the sponge <i>Spongisorites genitrix</i>	190
Fig. 3-89. HRMS spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	191
Fig. 3-90. Proton NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A) in DMSO- <i>d</i> ₆	192
Fig. 3-91. Carbon NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A) in DMSO- <i>d</i> ₆	193
Fig. 3-92. Proton NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	194
Fig. 3-93. Carbon NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	195
Fig. 3-94. Proton COSY spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	196
Fig. 3-95. HMQC spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	197
Fig. 3-96. HMBC spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).	198
Fig. 3-97. HRMS spectrum of bromotopsentin (96J-35-B).	199
Fig. 3-98. Proton NMR spectrum of bromotopsentin (96J-35-B).	200

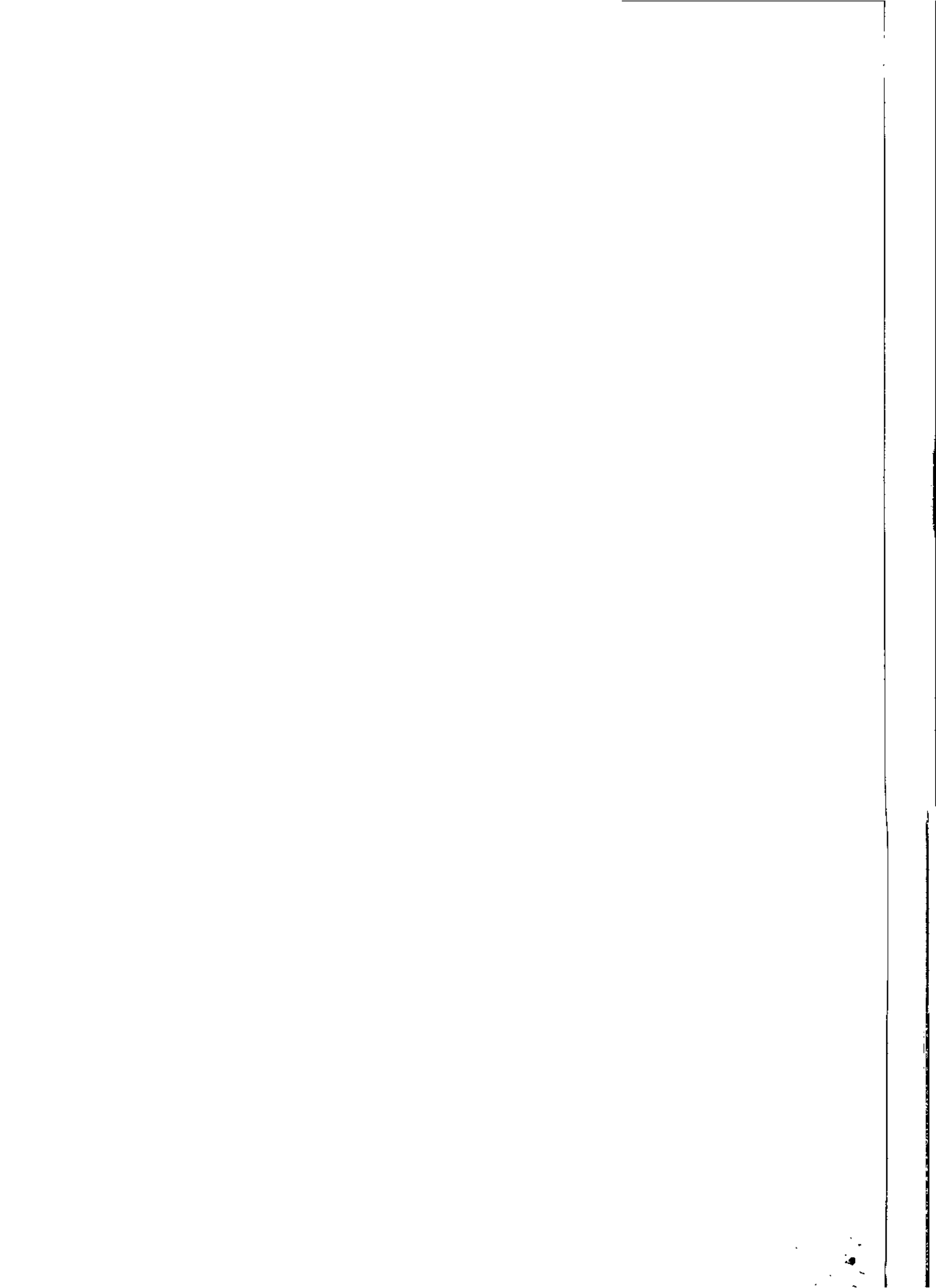
Fig. 3-99. Carbon NMR spectrum of bromotopsentin (96J-35-B),	201
Fig. 3-100. HRMS spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C),	202
Fig. 3-101. Proton NMR spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C),	203
Fig. 3-102. Carbon NMR spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C),	204
Fig. 3-103. NOESY spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C),	205
Fig. 3-104. HMBC spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C),	206
Fig. 3-105. HRMS spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D),	207
Fig. 3-106. Proton NMR spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D),	208
Fig. 3-107. Carbon NMR spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D),	209
Fig. 3-108. Structures of stellettadine A and stellettamide B,	211
Fig. 3-109. HRMS spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	224
Fig. 3-110. Carbon NMR spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	225
Fig. 3-111. Proton NMR spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	226
Fig. 3-112. Proton COSY spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	227
Fig. 3-113. HMQC spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	228
Fig. 3-114. HMBC spectrum of stellettadine A(96J-45-A),	229
Fig. 3-115. HRMS spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	230
Fig. 3-116. Carbon NMR spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	231
Fig. 3-117. Proton NMR spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	232
Fig. 3-118. Proton COSY spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	233
Fig. 3-119. HMQC spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	234
Fig. 3-120. HMBC spectrum of stellettamide B(96J-45-B),	235
Fig. 3-121. Structures of the sesquiterpenoids of the drimane class from the sponge <i>Dysidea</i> sp.	237
Fig. 3-122. HRMS spectrum of compound VJP-6-A,	255
Fig. 3-123. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-A,	256
Fig. 3-124. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-A,	257
Fig. 3-125. HRMS spectrum of compound VJP-6-B,	258
Fig. 3-126. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-B,	259
Fig. 3-127. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-B,	260
Fig. 3-128. HRMS spectrum of compound VJP-6-C,	261
Fig. 3-129. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-C,	262
Fig. 3-130. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-C,	263
Fig. 3-131. HRMS spectrum of compound VJP-6-D,	264
Fig. 3-132. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-D,	265
Fig. 3-133. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-D,	266

Fig. 3-134. HRMS spectrum of compound VJP-6-E ,	267
Fig. 3-135. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-E ,	268
Fig. 3-136. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-E ,	269
Fig. 3-137. HRMS spectrum of compound VJP-6-F ,	270
Fig. 3-138. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-F ,	271
Fig. 3-139. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-F ,	272
Fig. 3-140. HRMS spectrum of compound VJP-6-G ,	273
Fig. 3-141. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-G ,	274
Fig. 3-142. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-G ,	275
Fig. 3-143. HRMS spectrum of compound VJP-6-H ,	276
Fig. 3-144. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-H ,	277
Fig. 3-145. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-H ,	278
Fig. 3-146. HRMS spectrum of compound VJP-6-I ,	279
Fig. 3-147. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-I ,	280
Fig. 3-148. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-I ,	281
Fig. 3-149. HRMS spectrum of compound VJP-6-J ,	282
Fig. 3-150. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-J ,	283
Fig. 3-151. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-J ,	284
Fig. 3-152. Bromotyrosine-derived metabolites from sponges of the order Verongida,	286
Fig. 3-153. Structures of psammaplins A and B,	288
Fig. 3-154. HRFABMS spectrum of psammaplin A (VJP-3-A),	302
Fig. 3-155. Carbon NMR spectrum of psammaplin A (VJP-3-A),	303
Fig. 3-156. Proton NMR spectrum of psammaplin A (VJP-3-A),	304
Fig. 3-157. HRFABMS spectrum of psammaplin A (VJP-3-A),	305
Fig. 3-158. Carbon NMR spectrum of psammaplin B(VJP-3-B),	306
Fig. 3-159. Proton NMR spectrum of psammaplin B(VJP-3-B),	307



List of Tables

Table 2-1. US Government's Fy 1992 Investment in Research in Support of Marine Biotechnology.	35
Table 2-2. Number and sources of samples to be collected in the NCI program for screening during 1986-1991.	36
Table 2-3. Phyletic distribution of marine natural products -recent trend.	43
Table 3-1. Carbon NMR assignments for petroraspailynes A1-A3 and B1-B3.	65
Table 3-2. Proton and carbon NMR assignments for 96J-32-A.	151
Table 3-3. Proton and carbon NMR assignments for 96J-32-B.	153
Table 3-4. Proton and carbon NMR assignments for stellettadine A (96J-45-A).	214
Table 3-5. Proton and carbon NMR assignments for stellettamide B (96J-45-B).	217
Table 3-6. Proton and carbon NMR assignments for psammaphin B (VJP-3-B).	294



제 1 장 서 론



한 연구 노력이 부진한 다른 중요한 원인은 산업화, 응용화 연구를 통하여 천연물 연구의 주요 동기를 부여할 산업계의 시각에 내재해 있다. 즉 단기간의 연구 성과에 주력하는 국내 산업계의 특성상 장기간의 연구노력이 요구되고 물질의 분리 및 구조결정이 어려운 해양천연물을 외면하기 때문이다. 전기한 바와 같이 해양천연물이 갖고 있는 막대한 산업적, 학문적 중요성과 미래의 생명산업 발전을 위한 기반 확충의 필요성 등을 고려할 때 국내에서 이 분야의 연구는 매우 시급한 과제이다. 또한 21세기 국가 생존전략의 일환으로서 생물자원의 확보 및 개발에 역점을 두고 추진하는 세계적인 추세에 부응할 뿐만 아니라 우리 나라 연안의 해양 생물자원의 개발과 보호의 측면에서도 해양천연물에 대한 체계적인 연구는 대단히 중요하다.

해양천연물에 대한 외국의 기존 연구결과는 신물질의 발견 빈도에 있어서 해면동물이 여타의 해양 동·식물 및 미생물에 비하여 탁월함을 나타내고 있다. 지금까지 발견된 해양천연물 중에서 40% 이상이 해면동물로부터 추출되었으며 이들 중에서 상당수가 강력한 생리활성을 나타내어 현재 신의약품으로 개발중인 후보물질 중에는 해면동물의 천연물이 다수 포함되어 있다(신 등, 1992; 한국해양연구소, 1994; Faulkner, 1997). 해면동물은 고생대 이래로 오랜 기간 지구상의 환경에 적응하여 진화해 왔으며 현존하는 종의 수가 10,000을 상회하고 열대해역부터 남·북극 등 극한지에 이르기까지 전세계의 거의 모든 해양 환경에 다양하게 서식하고 있으며 우리 나라의 연안에도 600여종 이상이 발견되고 있어서 기존 외국의 연구노력에도 불구하고 천연물 탐색이 이루어지지 못한 종이 무수히 많다(심정자, personal commun.). 또한 이들의 대사물질에는 알려진 생합성적 기원을 가진 모든 물질들이 망라되어 있어서 물질의 분리 및 구조결정의 측면에서도 연구할 가치가 대단히 높다(제 2 장 참조).

본 연구진에서는 기 수행한 기초연구 '한국근해 저서 군체동물로부터 신물질 추출 연구' 등에서 우리 나라와 남극의 연안에 서식하는 해면동물로부터 생리활성 물질을 추출할 가능성이 매우 높음을 입증하였고 실제로 신물질을 포함한 10 여종의 생리활성 물질을 발견한 바 있다(해양연구소, 1994; Shin, et al, 1995). 그러므로 선진국에서 연구 대상으로 삼지 못하였던 우리 나라 근해와 남극연안의 해면과 외국의 해양생물학 연구진과의 공동연구에 의하여 선별되는 열대태평양의 해면에 대한 집중적인 연구는 기존 천연물과는 상이한 구조를 가진 생리활성 신물질을 발견할 것이 확실시 된다.

결론적으로 해면동물로부터 생리활성 물질을 추출, 구조를 결정하고 의·약학적 이용가능성을 탐색하는 본 연구는 현재 육상생물에 주로 국한되어 있는 국내의 기존 산·학·연의 천연물연구의 대상생물의 확대와 연구수준의 향상을 유도하며 유기화학, 의·약학, 생물·생태학 등 관련분야의 연구에 필수적인 정보와 연구수단을 제공하고 향후의 대규모 연구과제를 위한 기반이 되어 현재 국가적으로 추진되고 있는 생물자원의 개발과 생명공학의 발전에도 기여할 것이다.

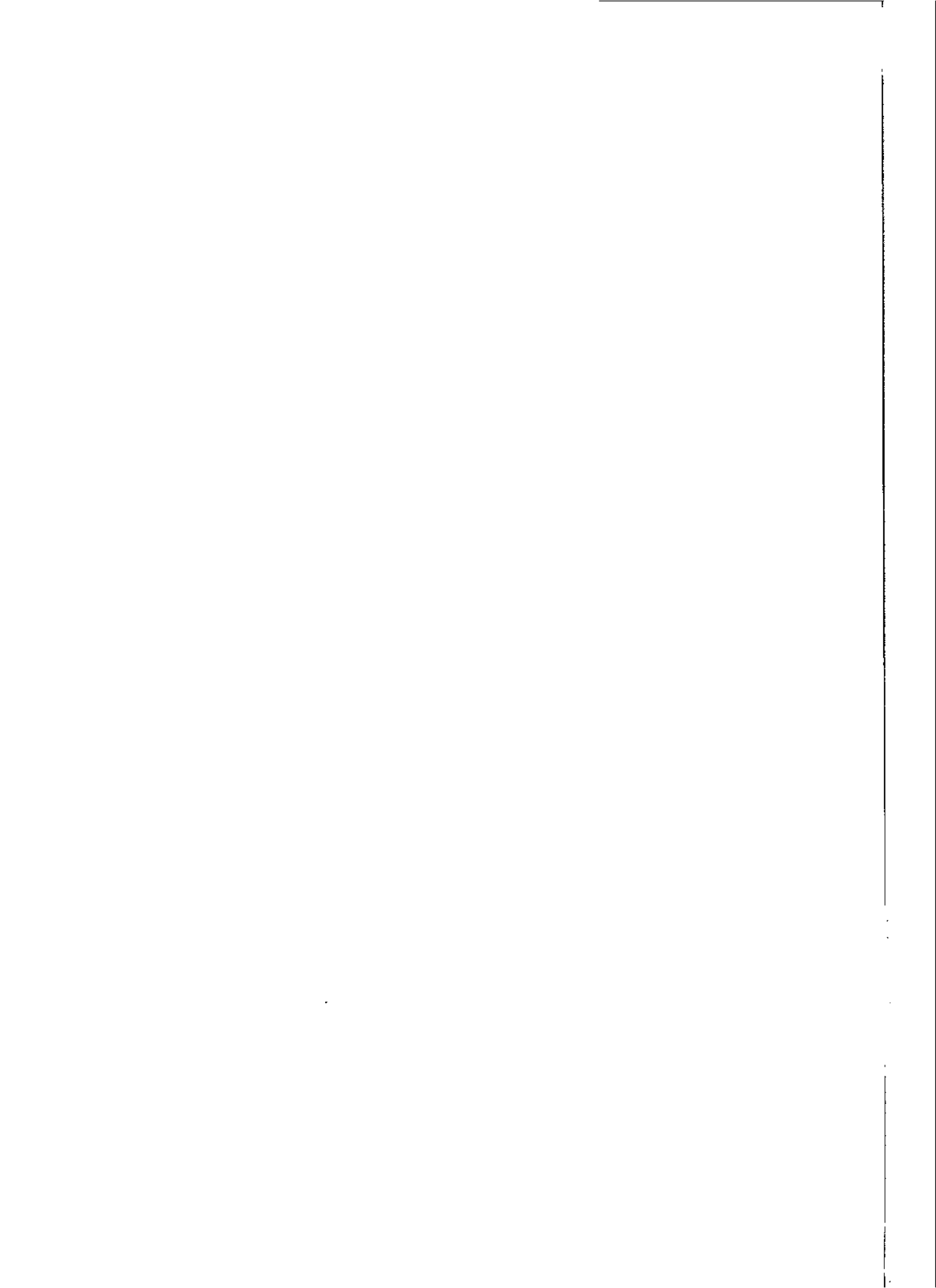
제 2 절 연구의 목표 및 범위

추천연구원 지원과제인 본 '해면동물로부터 생리활성물질 추출연구'의 궁극적인 목표는 다양한 해면동물로부터 신물질을 추출하여 산업적 개발가능성을 탐색하는데 있다. 본 연구에서는 정량적인 면에서 20 종 이상의 신물질을 목표로 하고 있으며 연구대상물질은 분자량 2,000 이하의 소형 유기물질이다. 기술적인 측면에서 본 연구의 범위는 시료의 채집에서 천연물의 분리, 구조 결정, 생리활성의 측정 등 일반적인 천연물 연구의 영역을 망라하고 있으며 대부분의 연구과정을 자체적으로 수행하여 향후의 대규모 해양천연물연구를 위한 기술 수준의 향상을 주로 도모하였다.

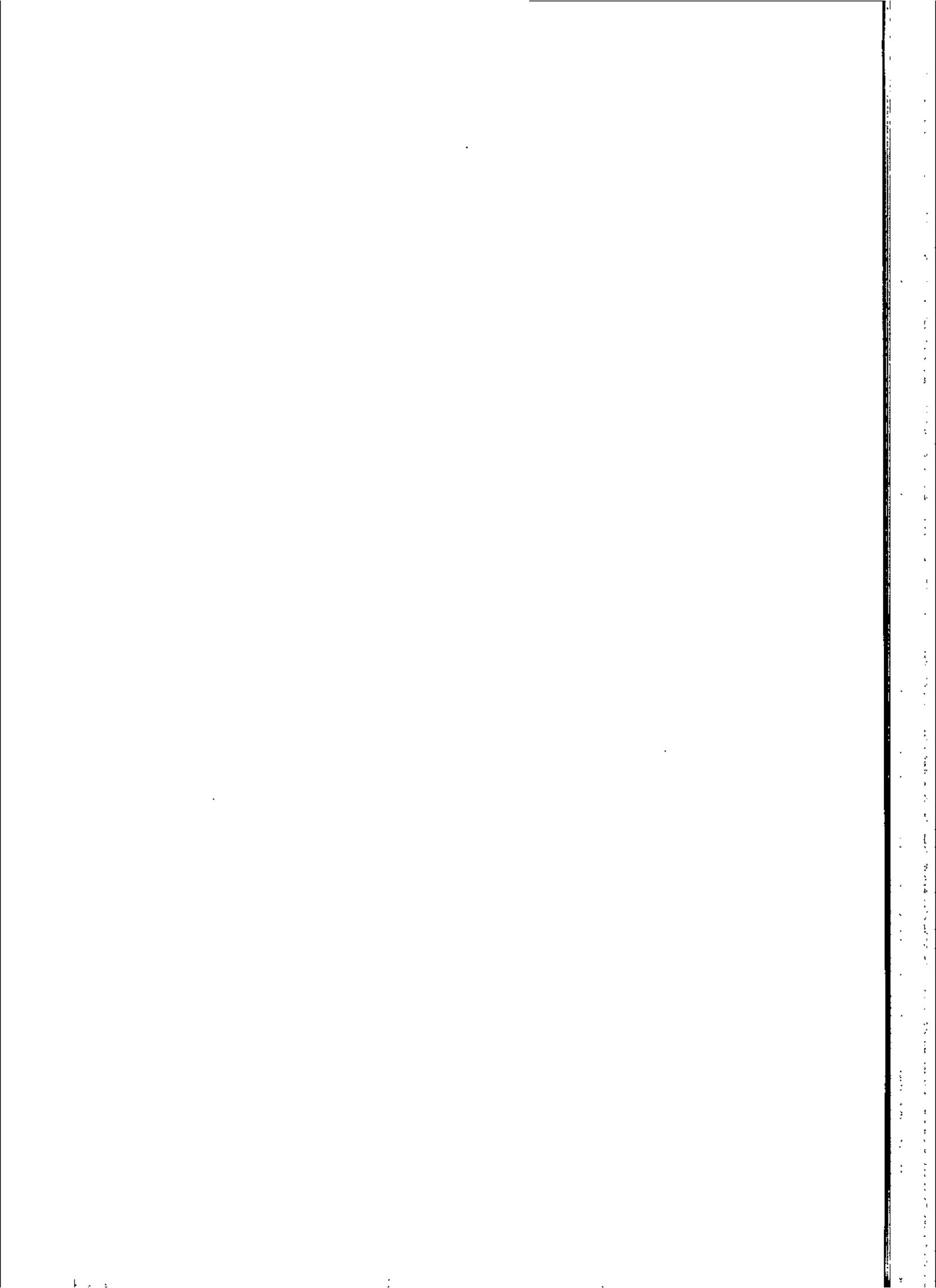
천연물연구에서 매우 중요한 시료의 채집대상 지역은 우리 나라의 남해 및 동해안과 남극의 연안, Guam 등 열대태평양의 도서 등이다. 시료는 특정한 강(Class)나 목(Order)에 구애받지 않고 천해에 서식하는 시료를 대상으로 하였으며 채집된 시료의 동정은 국내외 분류 전문가에 의뢰하였다. 이들 지역을 선정한 이유는 먼저 우리나라의 남해안과 동해안의 경성저질에 해면동물이 다수 서식하는데도 불구하고 이들의 천연물이 거의 보고되지 않았으므로 신물질을 발견할 가능성이 매우 높다. 남극의 연안에 서식하는 해면동물은 지역적 특성으로 오랜 기간 연구가 되지 않았으나 최근 국제적인 관심이 모아지고 있으며 본 연구진에서도 이들로부터 신물질 개발연구의 타당성을 입증한 바 있다(Shin, et al. 1995). 마지막으로 열대 태평양의 해면동물은 현재 전세계적으로 연구가 가장 집중되어 있는 지역으로서 매년 100여종 이상의 신물질이 보고되고 있으며 본 연구진에서는 Guam대학교와의 공동연구로 쉽게 접근할 수 있는 이점이 있다.

생리활성은 항진균 활성과 세포독성 및 항산화 활성을 중점적으로 측정하고 reverse transcriptase(RT), Na⁺/K⁺-ATPase, PLA₂, TOPO-I 등 수종의 효소에 대한 저해 활성도 포함되어 있다. 항바이러스와 항암 활성(*in vivo*)은 국내외의 전문 연구기관에 의뢰하였다. 천연물의 추출과 분리는 해양천연물화학에서 주로 운용되는 일반적인 크로마토그래피 방법을 이용하였고 물질의 구조결정은 NMR과 고해상 질량분석을 중심으로 IR, UV 등 분광학적 방법에 주로 의존하고 유기화학적 구조변환을 병행하였다.

제 1 차 년도에는 시료의 채집, 동정, 조 추출물에 대한 화학적 분석과 생리활성에 의한 중점 연구대상시료의 선정, 천연물의 분리정제 등이 주로 수행되었고 제 2 차 년도에는 선정된 시료의 대량채집과 천연물의 분리 및 구조 결정이 수행되었다. 최종 년도인 제 3 차 년도에는 분리한 신물질의 구조 결정의 완료와 정제된 천연물의 생리활성의 측정 등의 과정이 주로 이루어졌다.



제 2 장 국내외 기술개발현황



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 해양천연물 연구의 일반적인 현황

1. 연구의 발전과정 및 현황

해양천연물 연구는 육상천연물에 비하여 매우 짧아 불과 30여 년의 역사를 갖고 있다. '60년대 이전에도 해양생물의 대사물질에 대한 연구가 전무하였던 것은 아니었으나 주로 복어의 독(tetrodotoxins)나 패독(shellfish poison) 등 수산식품의 독성물질에 관한 연구가 간헐적으로 이루어졌을 뿐이다. 그러나 '50년대 말에서 '60년대 초에 이르는 기간에 카리브해에 서식하는 산호 *Plexaura homomalla*에서 prostaglandins계 유도체가 대량으로 추출되고 해면동물에서 항암성 물질인 ara-T(spongothymidine)과 ara-U(spongouridine)가 발견된 것이 해양신물질에 대한 본격적인 연구가 시작된 직접적인 동기이다. 특히 ara-U와 ara-T는 modified nucleoside계 신물질의 개발의 효시가 된 물질들로서 현재 항바이러스 및 항암제로 이용되는 ara-A, ara-C, acyclovir, AZT 등의 개발을 위한 선도물질의 역할을 훌륭히 수행하였다 (Rinehart, 1988).

초기('60-70년대)의 해양천연물 연구를 주도한 것은 넓은 해안과 다양한 해양환경을 갖고 있고 수산식품과 의약품에 대한 사회적 요구가 많은 미국, 일본, 이태리, 호주 등 4개국이다. 이 기간중의 연구방법은 매우 단순하여 조간대나 상부 조하대에 서식하는 해양생물을 무작위로 채집하여 관련분야인 육상천연물의 연구방법을 아무런 여과없이 적용하였기 때문에 많은 시행착오를 가져 왔다. 주요 연구대상생물은 홍조, 갈조류 등 대형해조류와 해면, 산호 등 일부의 저서 군체동물이었으며 빈번히 연구된 지역은 카리브해와 하와이, 호주의 대보초 및 서부 지중해 지역이었다. 이 기간의 해양신물질 연구는 대학 연구진 중심으로 소규모로 수행되었으며 연구의 주안점은 유기물질의 구조 결정이어서 신물질의 생리활성은 관심을 끌지 못하였다. 이에 따라 무수한 천연물이 생리활성을 비롯한 산업적 응용가능성을 무시한 채 사장되었으며 이 기간 중에 보고된 신물질 중 생리활성이 탐색된 물질은 5% 미만- 이것이 현재에도 해양천연물의 산업화를 저해하는 중요한 요인이다(Fenical, 1988). 산업체에서는 아직 해양천연물에 대한 관심이 미미하였으나 스위스의 거대 제약기업 Hoffman La Roche는 호주에 임해면연구소를 설치하여 많은 성과를 얻은바 있다.

'80년대 중반에 이르러 해양신물질 연구는 큰 변화를 맞게 되었다. 신의약품과 산업적 신소재에 대한 사회적 요구의 증가는 정부나 공공 연구기관의 적극적인 참여를 유도하게 되었으며 이에 따라 대규모의 전문연구진도 다수 생겨나게 되었다. 연구진의 구성에 있어서 각국 모두 종래의 단독 연구를 지양하고 산·학·연의 협동연구가 점차 보

편화되었으며 천연물화학 연구진을 중심으로 생물·생태학, 의·약학, 결정화학 등 관련 분야의 연구진이 콘소시엄을 형성하여 공동연구를 수행하는 예가 늘게 되었다. 대학, 민간연구소 차원의 소규모 독립적인 연구가 점차 사라지고 정부 혹은 국가 단체의 계획과 주도하에서 대형연구과제를 수행하는 예가 증가하게 되었다. 또한 특정한 생물이 생산하는 특정한 부류의 물질(예: 극피동물의 saponins이나 적조의 독성물질 등)이나 특정한 생리활성을 가진 물질(예: 항암, 부착저해제 등)에만 주력하여 연구효율의 극대화를 추구하는 연구진도 나타나게 되었다.

신물질에 대한 산업적 수요의 증가는 종래의 무작위적인 연구를 지양하게 되고 생물·생태학적 정보를 근간으로 하여 체계적인 스크리닝, 생리활성에 의한 천연물의 추적(activity-guided separation), 천연물의 구조 변환, 유도체의 합성 등 응용 가능성의 제고에 점차 주력하게 되었으며 이에 따라 물질특허의 출원도 빈번히 이루어지게 되었다. 산업계에서도 해양신물질에 대한 관심이 고조되어 미국의 Sea Pharm 등의 제약회사가 직접 해양천연물을 연구하여 300여 신물질을 발견하는 등 이 분야의 연구에 큰 기여를 하였다. Bryostatins(이끼벌레 - 항암), didemnins(원색동물 - 항바이러스, 면역억제), dolastatins(연체동물 - 항암), halichondrins(해면동물 - 항암), manoalide(해면동물 - 소염) 등은 현재 의약품으로 개발된 대표적인 천연물이며 pseudopterosins(강장동물 - 소염)는 이미 기능성화장품으로 개발되어 '90년대 초부터 시판되고 있다.

기술적인 면에서 '80년대에 새로이 개발된 multi-dimensional nuclear magnetic resonance(NMR), fast atomic bombardment mass(FABMS) 등 유기분석기술의 도입은 해양천연물 연구를 비약적으로 발전시키게 되었고 이 분야가 육상천연물연구로부터 분리하게 된 결정적인 계기가 되었다. 즉 종전의 기술 수준으로는 주로 분자량 500 이하의 소형물질만 구조를 결정할 수 있었으며 물질의 양도 수 십 mg 이상이 필요하였으므로 구조적으로 매우 복잡할 뿐만 아니라 육상천연물보다 상대적으로 소량이 추출되는 해양천연물의 개발이 매우 더디었다. 그러나 NMR과 FABMS의 개발은 구조의 규명이 가능한 물질의 분자량을 2,000 내지는 그 이상으로 확장시켰으며 물질의 양도 수 mg 내지는 1 mg 이하로도 가능하게 되었다. 이에 따라 새로이 보고되는 해양천연물의 수도 급증하게 되었으며 이미 10,000 이상의 신물질이 알려져 있다.

생리활성에 있어서는 종래에 널리 이용되던 항미생물, 세포독성 등 일반적인 활성은 점차 지양되고 효소저해, 면역조절 등 특정한 기작 중심의 목적 지향적인 활성검색으로 변화되기 시작하였다. 연구대상 천연물에는 소형 유기물질 외에 효소나 고분자물질 등 거대물질이 추가되었으며 연구의 대상생물에 있어서는 대형해조류가 점차 퇴조하는 대신 해면과 강장 및 원색동물 등 저서 군체동물에 연구가 집중되었고 신물질의 새로운 원천으로서 해양미생물의 가능성이 논의되기 시작하였다. 생물의 채집 지역도 가까운 연안에서 벗어나 점차 자국의 해외 영토나 외국의 해역으로 확장되었으며 심해저나 극한환경에 서식하는 생물도 관심을 모으게 되었다. 특히 Phonpei, Fiji, Philippine, New Caledonia 등 열대 태평양 해역이 새로운 연구지역으로 부상하였다. 시료의 채집방법은

종래의 skin-SCUBA이외에 잠수정을 이용하기에 이르렀다.

'80년대 후반에 시작되어 현재까지 선진국에서 진행되고 있는 연구경향을 요약하면 다음과 같다.

	전통적인 접근방법	새로운 경향
· 연구의 중심	대학등 소규모 연구진	- 대형 연구기관의 전문 연구진
· 연구의 방향	· 유기화학적 구조분석	- 생리활성 등 응용가능성
· 연구대상 물질	분자량 500 이하의 물질	- 분자량 2,000 으로 확대 유용효소 및 고분자물질
· 연구대상 생물	저서군체동물, 대형해조류	- 미생물, 심해와 극한지생물
· 연구대상 지역	· 자국의 연안(미국, 일본, 호주 의 연안, 지중해, 카리브해 등)	- 외국(개도국) 및 자국의 해외영토(열대서부태평양)
· 시료 채집방법	스킨스쿠바(조간대 및 상부 조하대), 무작위 채집	- 잠수정(심해), 생태적 정보 에 의한 선택적 채집
· 생리활성도	· 일반적 생리활성도(항미생물, 세포독성등)	- 기작중심(특정효소저해, 특정 질병억제, 부착저해 등)
· 물질의 추적 방법	· 주 대사물질 중심, 수 십 mg 이상	- 생리활성도에 의존, 수 mg 이하

즉 현재에도 전통적인 연구방법이 주류를 이루고 있으나 이 분야의 선도연구진에서는 기존의 연구방법에 위에 열거한 새로운 연구방법을 최소한 한 두 가지 접목하여 연구를 수행하고 있다.

요약하여 지난 30여년 간의 막대한 연구투자로 선진국의 해양신물질 연구는 학문적인 면에서 이미 성숙기에 진입하였으며('97년의 경우 450편 이상의 연구논문 발표) 유명 학술지에 보고되는 등 질적인 면에서 육상천연물을 압도하고 있다. 그러나 신물질 및 유용물질의 산업화는 학문적 발전에 비하여 상당한 격차를 나타내어 산토닌, agar, carragenan, alginic acid 등 예전부터 이용되어 온 수 종의 물질과 10여종의 실험용 시약 및 '95년에 시판되기 시작한 소염제 pseudopterosins를 제외하고는 전기한 물질들을 포함하는 20여종의 물질이 임상실험 및 대량생산 방안을 연구중에 있는 정도이다. 그러나 주요 선진국 특히, 미국과 일본의 정부와 산·학·연에서는 가까운 미래에 육상생물을 대체할 천연 유용물질의 보고로서 해양생물을 인식하고 연구의 노력을 배기하고 있다.

신물질을 새로운 보고로 각광을 받을 것이다.

몸이 그 근해에 서식하므로 기존의 해양생물과는 상이한 구조와 생리활성을 가진 해양 생물에 서식하는 생물에 국한되었는데 비하여 전혀 다른 물리적 환경 하에서 다양한 지시생물 확대될 것이다. 특히 남극은 현재까지의 천연물 연구가 주로 열대와 온대의 지위도 지역 포함, ASEAN국가의 연안 등 현재 연구가 미비한 지역과 국한지와 심해 등 특수환경으로 구의 대상으로서 제한적으로 연구될 것이다. 연구대상 지역은 기존의 지역이외에 서부인 대부분 파악된 상태이므로 신물질의 개발대상 보다는 유용물질의 대량생산 및 산업화 연구가 예상되며 비약적으로 발전할 것이다. 대형해조류는 자원의 양이 많으나 천연물이 기술적인 문제가 해결될 경우 향후 수 십년간 유산미생물에 필적할 정도로 집중적인 투 의 관리, 보존 및 대량배양 등 기술개발의 어려움으로 다년간 정제되어 있는 공여로서 기간이 끝나는 연구의 연구를 주도할 것이다. 해양미생물은 연구의 잠재력은 매우 높으나 생물 종과 서식환경이 매우 다양하고 신물질이 지속적으로 발견되고 있으므로 미래에도 오랜 미생물에 연구가 집중될 것이다. 저서 군체동물은 상당기간의 연구에도 불구하고 생물의 진균·특히 symbiotic lower fungi와 filamentous higher fungi, archaeobacteria 등 연구대상 생물은 해면, 갯장, 원색동물 등 저서 군체동물과 단세포조류 및 방선균 다.

구방법이 개발됨에 따라 해양생물 유래 고분자물질을 유래 고분자물질에 대한 연구가 매우 활발해 질 것이 결정구조 분석을 제외하고는 구조의 결정이 불가능하였으나 3차원, 4차원 NMR에 의한 연 등 수용성 고분자물질의 중요성이 증가할 것이다. 특히 고분자물질은 오랜 기간 x-ray 단 천연물에서의 접근이 가능해질 것이다. 또한 표소와 polysaccharides, glycoproteins 1 mg 이하로 내려가고 있다. 이에 따라 최근까지 양적인 문제로 구조 결정이 불가능하였 유기화학과의 생화학의 경계를 무너뜨린 것이다. 또한 구조 결정이 가능한 천연물의 양도 다. 최근 일본에서 보고된 바와 같이 50여 아미노산으로 이루어진 천연물의 구조 결정은 석 기술 등 유기분석기술의 지속적인 발전은 천연물의 구조 결정의 한계를 확장하고 있 연구대상 천연물의 범위가 더욱 확대될 것이다. 다차원 NMR 기법과 새로운 질량은

가) 연구대상의 확대

가치 연구 경험을 살펴보면 다음과 같다.

Products Section에서 논의되었던 최근의 시도를 중심으로 가까운 장래에 본격화된 몇 2월에 개최된 Gordon Research Conferences - Frontiers in Sciences of Marine Natural 확히 예측하는 것은 매우 어려우나 외국에서 지난 2, 3년간에 보고된 연구 사례와 '96년 해양생물 연구의 방향과 접근방법은 미래에도 끊임없이 변화할 것이다. 이를 정

2. 미래의 연구방향

나) 연구방향의 다변화

미래의 해양신물질 연구는 현재까지 주로 진행되어온 생물로부터 천연물을 추출하여 그 구조와 생리활성을 측정하는 등의 전통적인 연구개발 방법이 상당기간 지속될 것이나 약화학(medicinal chemistry)과 생물유기화학(bioorganic chemistry)의 방향으로 크게 발전할 것이다. 즉, 천연물 자체의 생리활성 뿐만 아니라 천연물을 유기화학적으로 변화시킨 유도체의 생리활성, 천연물의 용액 내에서의 3차원적 형태나, 천연물과 체내 효소나 DNA와의 결합의 기작 등이 중요한 연구 테마가 될 것이다. 또한 천연물 자체의 전합성(total synthesis) 외에 해양천연물의 독특한 활성 기작에 기초한 대표물질(leading compounds)의 합성이 활발히 시도될 것이다. 이러한 연구는 그 자체의 학문적인 목적이외에도 연구결과가 신의약품의 개발에 직결되므로 산업적 가치가 매우 높아 해양천연물 연구의 중요한 부분으로 등장할 것이다. 따라서 현재 독성물질로만 분류되고 있는 적조독(red-tide toxins)등 많은 해양천연물이 새로운 관심의 대상으로 등장할 것이며 연구용 시약으로 이용되는 해양천연물이나 유도체의 수도 급증할 것이다.

해양천연물의 응용방향도 보다 넓어져서 의약품이나 준의약품 이외의 개발가능성이 활발히 논의될 것이다. 최근 미국의 Scripps 연구소에서 보고된 예로서 해양천연물을 이용한 양식새우(*Palaemon macrondactylus*)의 진균에 의한 질병퇴치나 일본에서 시도하고 있는 저서생물에 대한 부착방지제의 개발(Fusetani Biofouling Project) 등의 연구결과는 시사하는 바가 크다. 이와 병행하여 천연물을 이용한 해양생물의 생리생태에 대한 연구 및 그와 반대되는 방향인 생태적으로 특이한 생물로부터 원인물질을 규명하고 산업적으로 개발하려는 시도가 매우 활발하여질 것이다.

다) 신물질 및 유용물질의 대량생산

미래의 해양천연물 연구는 천연물의 산업화 및 생리활성 신물질의 대량생산 등 응용화 방법의 개발에 집중될 것이다. 현재 해양천연물의 산업화를 저해하는 가장 큰 요인은 유용물질의 대량생산의 어려움이다. 일반적으로 해양천연물은 육상천연물에 비하여 생물체 내의 농도가 대단히 낮아 자연에서 산업화에 충분한 양의 물질을 확보하는 것이 대부분의 경우에 있어서 불가능하다. 이를 해결하기 위한 방안으로 해양생물의 대량양식, 유전공학적 기법의 적용, 해양미생물의 대량배양 등이 활발히 시도될 것이다. 이들 중 응용하고자 하는 천연물을 생산하는 해양생물을 대량으로 양식하여 천연물을 추출하는 것은 비용이 비교적 저렴하고 단기간에 양식방법의 개발이 가능할 것으로 생각되는 해양생물이 적지 않아 많은 관심을 모으고 있다. 최근 미국의 국립 암 연구소(National Cancer Institute)와 뉴질랜드에서는 유력한 항암제 후보물질인 halichondrins과 bryostatins를 각각 생산하는 해면동물 *Lyssodendryx*와 이끼벌레 *Bugula neritina*의 대

량양식을 시도하여 부분적으로 성공한 바 있다. 해양미생물 특히 공생미생물의 대량배양에 의한 유용물질의 대량생산은 이론적으로 충분히 타당하며 여러 연구진에서 시도되고 있으나 현재까지 성공하지는 못하였다. 이 방법의 성공을 위해서는 해양미생물의 효과적인 분리 및 배양에 대하여 종래의 학계에 통용되는 개념에서 완전히 탈피하여 접근방법의 혁신적인 전환이 있어야 할 것이다. 유전공학적 기법의 응용 역시 이론적으로 충분한 배경을 갖고 있으며 적용 범위가 넓어 연구가치가 대단히 높으나, 이 방법을 적용하기 위해서는 먼저 대상 생물의 genetic mapping을 통하여 목표하는 천연물의 생산을 지시하는 유전자의 부분을 결정해야 하는 등 선행되어야 할 연구가 많고 현재 해양동물의 유전자를 조작하는 기술이 미비한 실정인바 가까운 시일에는 실현이 어려울 것이다. 상기 세 가지 접근방법의 성공은 해양생물 유래 신물질의 산업화에 있어서 결정적인 계기가 될 것이다.

3. 주요 국가의 연구 현황

가) 미국

해양생물 유래 신물질 및 유용물질에 대한 연구를 주도하여온 국가는 미국이며 미래에도 상당기간 이러한 추세는 계속될 것이다. 현재 미국의 정부와 민간의 산·학·연에서는 21세기를 주도할 미래과학으로서 생명공학의 중요성을 널리 인식하고 있으며 그 중 한 분야로서 해양 생명공학 연구의 필요성을 강조하고 있다. 이를 단적으로 드러낸 예가 '93년도 정부예산 편성을 위하여 연방과학기술 조정위원회(Federal Coordinating Council for Science, Engineering and Technology : FCCSET) 산하의 생명공학 보건위원회(Committee on Life Sciences and Health)가 '92년 2월에 발간한 대통령 자문보고서에 21세기 생명공학 발전을 위한 11개 전략분야중의 하나로서 해양 생물공학을 포함시키고 있는 점이다. 더구나 이에 포함된 대부분의 분야가 농업, 보건, 환경, 에너지 등 포괄적인 연구분야인데 비하여 해양생물공학과 게놈계획(Genome Projects)만이 구체적인 연구대상을 갖고 있는 분야라는 데서 해양생물공학의 중요성은 더욱 분명히 드러난다. 동 보고서에 나타난 미국 정부의 '92년도 해양생물공학 분야의 연구규모는 직접 투자분이 약 4400만 달러이며 이중 해양천연물(대상: metabolism)이 1380만 달러로 최대규모이다. 이 금액은 연구를 담당하는 부서의 직접 투자규모이며 보건, 환경, 농업등의 분야로부터의 간접 투자분을 포함하면 그 규모는 훨씬 많다.

미국에서 해양생물 유래 신물질 개발에 대한 공공연구는 NIH(National Institute of Health)와 National Sea Grant College Program등 두 가지 기관에 의하여 주로 지원되고 있다. NIH와 그 산하의 NCI(National Cancer Institute:국립암연구소)는 항암제,

Table 2-1. US Government's Fy 1992 Investment in Research in Support of Marine Biotechnology (from FCCSET report, 1992) (\$ Million)

	EPA	NIH	NOAA	NSF	USDA	ONR	FWS	FDA	DOE	Total
Mol. genetics	0.3	1.8	1.2	0.7	2.0	2.0	0.2	3.1		11.3
Biomaterials			0.2							0.2
Metabolism	0.1	8.0	1.0	2.5		2.0			0.2	13.8
Biofilms	0.1		0.2			1.0				1.3
Bioprocessing	0.2		0.4	1.2		2.0			0.2	4.0
Environment				3.5						3.5
Aquaculture		2.1	2.9	0.1	4.1		0.1	0.3	0.2	9.8
Total	0.7	11.9	5.9	8.0	6.1	7.0	0.3	3.4	0.6	43.9

결핵치료제 등 특정효능을 가진 물질의 개발에 주도적인 역할을 하고 있다. 이들은 자체의 연구진에 의하여 신물질 개발연구를 직접 수행할 뿐만 아니라 외부와의 공동연구(대학 및 민간 연구소와 contract-base에 의한 연구)를 수행하고 있다. 또한 중점 연구방향의 제시, 새로운 연구방법 및 기술의 제공, 연구결과의 응용등 신물질 개발의 전반적인 과정에 직접 참여하고 있다. 해양신물질 연구에 있어서 NIH의 적극적인 참여를 알 수 있는 중요한 사례로는 '90년 동 연구기관의 지도 감독 하에 미국내의 6개의 천연물화학, 약학, 결정화학분야 첨단 연구진이 장기연구를 위한 콘소시엄을 형성하여 Philippine남부 Cebu섬에 임해기지를 건설하여 연근해에 서식하는 해양생물자원의 조직적인 확보와 신물질연구를 수행한 것을 들 수 있다.

NCI가 이 분야에 참여하는 정도를 파악할 수 있는 예로는 '88~'91년간 항암제의 개발을 위하여 전세계에 서식하는 36,000여 동·식물과 미생물에 대한 자체적인 screening program중 35%에 해당하는 대상생물이 해양생물이라는 점이다. 또한 전기한 바와 같이 이끼벌레로부터 분리된 강력한 항암물질 bryostatins의 대량생산 및 산업적 개발을 위하여 California 대학의 연구진과 공동으로 세계 최초로 특수한 해양생물인 이끼벌레의 유전적 변형과 대량양식을 추진하고 있으며 항암물질 halichondrin을 생산하는 해면동물의 대량양식을 New Zealand에서 직접 추진하고 있다.

NIH/NCI가 대형 연구과제 중심으로 특정목적의 집중적인 신물질 개발에 직접 참여하는데 비하여 National Oceanic and Atmospheric Administration(NOAA) 산하의 National Sea Grant College Program은 대학 및 이와 연계된 민간연구진의 장기적인 기초 및 응용연구를 지원하고 있다. 이 program은 1966년에 시작되었으며 26개 주정부와

Table 2-2. Number and sources of samples to be collected in the NCI program for screening during 1986-1991 (from Suffness & Thompson, 1988)

<u>Marine Macroorganisms</u>	
5,000, shallow water (<30 m), Indo-Pacific temperate and tropical regions	
5,000, deep water (30-800 m), Caribbean and Atlantic regions	
<u>Tropical Rainforest Plants</u>	
7,500, Southeast Asia	
7,500, Africa and Madagascar	
7,500, Central and South America	
<u>Microorganisms</u>	
1,500, fungi-soil origin	
1,500, cyanobacteria-soil and other origin	
2,000, diverse marine microorganisms (to be initiated in 1988)	

연계하여 연간 350만불 이상을 50여 개 대학 연구진에 지원하고 있다. Sea Grant Program은 오랜기간 각 대학의 단독 연구를 지원해 왔으나 80년대 이후에는 수 개 연구진의 공동연구를 지향하는 경향이 높아지고 있다. California 대학의 4개 연구진이 동 program의 지원하에 공동으로 해양생물로부터 신규 소염물질을 연구하여 manoalide(해면), pseudoterosins(산호), fuscoides(산호), halimide(진균) 등 신약 후보물질을 개발하였고 pseudoterosin의 경우 산업화를 이룬 것은 대표적인 성공 사례이다. 또한 21세기의 플라스틱으로 불리우는 기능성 고분자 chitosan의 개발도 동 프로그램의 장기적인 지원에 의하여 성공한 것이다.

상기 program이외에도 University of California, Santa Barbara의 Center for Marine Biotechnology, Scripps Institution of Oceanography(SIO), Woods Hole Oceanographic Institute(WHOI), Harbor Branch Oceanographic Institution(HBOI) 등 대형 연구기관과 무수한 모험기업들이 정부기관의 지원하에 과제를 수행하고 있으며 American Cyanamid, Smith-Kline 등 거대제약 기업에서도 독자적 혹은 산·학·연 공동으로 해양신물질 개발 및 산업화 연구를 하고 있다.

나. 일본

일본은 해양신물질 연구에 있어서 미국에 버금갈 정도로 연구노력이 활발하며 적조의 독성물질 등 일부 분야에서는 연구수준이 미국을 능가하는 것으로 평가받고 있다. 일본에서의 천연물을 비롯한 해양생명공학 연구는 80년대 이후 상당부분 정부 주도하에 연

구가 수행되고 있으며 통산성, 과학기술청, 농림수산성 등 관계기관에서 지원하는 총 규모는 '92년의 경우 2억 달러에 달하여 미국을 훨씬 능가하고 있다. 이들 정부기관은 대부분 자체 연구소를 보유하고 있으며 지방정부에서도 많은 역할을 담당하고 있다. 중요 과제로는 통산성에서는 Marine Communitypolis 구상에 속한 '해양생물로부터 고기능 정밀화학제품의 연구개발' (NEDO, '90년 12억엔, '88년부터 7년간 150억엔 예정) 과제를 중점적으로 수행하며 이와 관련하여 해양생물의 산업적 이용에 관한 연구센터(Research Center for the Industrial Utilization of Marine Organisms Co., MOC)를 건립, 운용하고 있다. 과학기술청에서는 '71년에 건립한 일본 해양과학 기술센터(Japan Marine Science and Technology Center, JAMSTEC)을 중심으로 Aquamarine 계획하에 심해 미생물의 산업적 이용(7.9억엔), 농림수산성의 Marine Vision 구상의 세부과제로서 수산업에 있어서의 신기술 개발과 실용화 및 Marine Frontier Project 등 해양생물로부터 유용물질을 개발하는데 관여하는 중요 과제를 다수 수행하고 있다.

민간연구 개발조직으로는 300여개 기업과 15,000여 대학내 연구원으로 구성되어 공동으로 인적자원 개발, 정보교환, 계획수립등을 담당하는 생물공업개발센터(Bioindustry Development Center, BIDEC)와 '88년 24개 민간기업이 연합하여 설립한 해양생물공학연구소(Marine Biotechnology Institute Co, MBI) 등이 있으며 특히 해양생물공학연구소는 '88년부터 "Fine Chemicals from Marine Organisms" 프로그램을 통하여 해양신물질 개발에 직접 참여하고 있으며 신의약 뿐만 아니라 계면활성제, 발색제, 접착제, 부착방지제 등 해양생물 유래 기능성 고분자와 유용 효소제의 개발에 대한 기초 및 응용연구에 8년간 260억엔을 투자하고 있다. 이 기관과 동경대 공동으로 설립된 Fusetani Biofouling Project의 부착방지제 개발업적은 널리 알려져 있다. 기타 Mitsubishi, Sankyo, Santory등 민간기업에서 독자적으로 유용물질 연구를 수행하고 있으며 벤처기업도 다수 참여하고 있다.

다) 기타의 국가

호주는 '70년대 중반 스위스의 거대 제약기업인 Hoffman La Roche가 세계 최초로 Townsville에 임해연구소를 설립하여 해양천연물을 연구하였던 영향을 받아 미국, 일본, 이탈리아와 더불어 초기의 해양천연물 연구를 주도한 국가중의 하나이다. '80년대 초반 Roche가 철수한 이후 해양 유용물질에 대한 연구는 한동안 대학 연구진 차원에서만 이루어졌으나 '80년대 후반 정부의 "New Investment Promotion Program"의 일환으로 다시 연구가 활성화 되었다. 특히 Townsville에 공공 연구소인 Australian Institute of Marine Sciences(AIMS)가 설립되어 연구가 매우 활발하다. AIMS는 호주정부의 적극적 지원 하에 자국의 연안 외에 Indonesia등 ASEAN 국가에까지 진출하여 생리활성 신물질과 기능성 유용물질에 대한 연구를 수행하고 있다. 최근 호주는 자국연안의 해양생물-신물

질 연구개발 대상생물-에 대한 강력한 보호주의를 천명하여 외국 연구진의 접근을 원천적으로 봉쇄하는 등 국가적인 차원에서 해양신물질 개발에 관여하고 있다.

러시아에 있어서의 해양생물 유래 유용물질에 대한 연구는 과학 아카데미 극동 branch 산하의 Pacific Institute for Bioorganic Chemistry(PIBOC)에서 주도하고 있다. 주요 연구대상은 소형 유기물질과 다당류와 효소제 등이며 다양한 해양생물 시료의 채집을 위하여 열대 태평양등 외국의 해역에까지 영역을 넓히고 있으며 연구자금의 원활한 조달을 위하여 국제공동연구를 시도하고 있다.

기타 국가의 해양신물질 개발 연구를 살펴보면 이태리, 프랑스는 대부분 소규모 장기 project 차원에서 수행하고 있다. 특이한 예는 Spain의 PharMar사로서 80년대 초반 미국의 Florida와 유럽을 중심으로 해양 유용물질에 대한 민간 전문기업으로 많은 활약을 하던 Sea Pharm사가 활동을 중단한 뒤 Sea Pharm의 Spain branch가 독립하여 설립된 동 기업은 해양생물 유래 신의약품의 개발에만 주력하는 기업으로서 최근 상당한 연구결과를 얻고 있다. 중국, 인도, 칠레등 개도국에서도 최근 상당한 연구 결과가 보고되며 ASEAN 국가에서는 연구 수준은 아직 낮으나 해양생물에 관한 강한 보호주의를 천명하고 있다.

4. 국내의 연구개발 동향

해양생물 유래 신물질에 대한 국내의 연구노력은 대단히 미미하다. 이는 국내의 천연물 및 생명공학 연구수준이 전반적으로 낙후되어 있는데 기인하는 바가 크지만 무엇보다도 국내의 관련분야의 연구관심에서 해양생물이 배제되어온 것이 가장 큰 이유이다. 국내의 천연 유용물질 연구진의 주된 관심은 전통 약용식물과 토양 방선균 등 육상생물에 머물러 있으며 산업계는 그 특성상 단기연구에 의한 최종 상품의 개발 및 제품화에만 관심이 집중되어 있어서 장기적인 연구에 의한 새로운 물질의 개발은 상대적으로 소외되어 있는 실정이다. 특히 선진국에서도 산업화의 초기 단계에 있고 대부분의 제품이 개발 중에 있는 해양생물 유래 유용물질에 대한 연구노력은 찾아볼 수 없다. 그러나 최근 학계와 연구계를 중심으로 해양생물에 대한 관심이 점차 고조되고 있으며 수 개의 연구과제에서는 상당히 우수한 결과가 도출되고 있으므로 가까운 시일에 이 분야의 연구도 활성화 될 것이 확실하다.

현재까지 국내에서 이 분야에서 수행 완료 혹은 수행중인 중요 연구과제를 주제 별로 살펴보면 다음과 같다.

- 한국근해 저서 군체생물의 천연물(해양연구소)
- 해양미생물로부터 EPA 및 기타의 고도불포화지방산 생산(해양연구소)
- 해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발(해양연구소)

- 해양천연물로부터 효소저해제 탐색(해양연구소, 생명공학연구소)
- 적조독성물질 탐색(해양연구소, 부경대학교, 수산진흥원)

이들 중에서 한국해양연구소에서는 현재 해양신물질에 관한 연구를 수행하는 국내 유일의 전문 연구기관으로서 한국근해와 남극연안의 저서 군체동물로부터 100 여 신물질을 분리, 구조를 결정한 바 있으며 이들 중 생리활성도가 우수한 pectenotoxin-II(항암), suberitenone B(고지혈증 억제), solandelactones C와 G(효소저해), euplexides(항암, 항산화) 등의 물질에 대한 후속연구를 수행중이다. 또한 고지혈증 억제, 심장질환 예방, 항암 등의 다양한 생리활성 효과를 가진 것으로 유명한 eicosapentaenoic acid(EPA) docosahexaenoic acid(DHA)등에 대하여 미생물에 의한 대량생산 연구를 수행중인 바 이미 이들을 대량 생산하는 수종의 균주를 분리한 바 있다. 또한 superoxide dismutase(SOD), phospholipase, haloperoxidase 등의 효소를 해양미생물로부터 분리하였으며 유전공학적 기법을 이용하여 해양미생물유래의 PLA₂를 대장균에서 발현시키는데 성공하였다. 적조 플랑크톤이 생성하는 패독은 국민보건에 미치는 영향이 매우 크고 생리활성 신물질의 개발가능성이 높아 수산진흥원, 경상대, 부경대, 해양연구소 등에서 비교적 많은 연구노력을 기울여 왔으나 플랑크톤의 순수 대량 배양 등 생물학적 과정의 어려움으로 인하여 우수한 결과를 낳지는 못하고 있다. 이외에도 부경대, 성균관대, 순천향대, 경상대, 영남대, 경성대 등의 대학에서 소형 유기 천연물과 생리활성 당단백질, 기능성 다당류 등에 대한 연구를 하고 있다.

국내의 해양천연물 연구의 기술수준을 각 중심 기술별로 선진국과 비교하면 아래와 같다(선진국의 수준을 100으로 하였을 때의 국내 수준).

해양생물의 분류	70
해양미생물의 분리 및 배양	60
천연물의 분리 및 구조결정	60
생리활성 측정	80
효소 및 거대물질 분리, 정제	60
유용물질의 대량생산(유전공학)	60
유도체 합성 및 대량생산(유기화학)	70

상기의 표에 나타난 바와 같이 국내의 해양신물질 연구수준은 거의 모든 단위기술에 있어서 선진국에 비하여 상당히 낙후되어 있으며 연구층이 대단히 얇아 수 개 세부분야(예 : 신물질의 구조 결정, 해면, 강장동물의 분류, 유전공학 기법에 의한 대량생산 등)

에 있어서는 국제적 수준에 도달한 국내의 전문가가 1 내지는 수명에 불과한 실정이다. 또한 연구진간의 연구능력의 편차가 심하며 현재 대부분의 천연물 연구진이 해양천연물이 아닌 육상생물 기원 물질에 주력하고 있으므로 연구의 활성화를 위해서는 연구인력의 확충이 필요하다.

제 2 절 해면동물의 천연물

해면동물(phylum Porifera)은 고생대에 이미 지구상에 출현하였으며 기후와 환경의 변화에 적응하며 진화를 거듭하여 왔다. 이들은 현존하는 해양동물 중에서 가장 다양한 생물의 하나로 전세계에 10,000종 이상이 서식하는 것으로 알려져 있다. 이들의 분포는 대단히 넓어 열대에서 극한지에 이르는 거의 모든 해역에 서식하며 조간대로부터 수심 9,000 m의 심해에서도 발견된다. 또한 드물기는 하나 Baikal 호와 같은 내륙의 호수에서도 발견된다. 우리 나라 근해에서는 석회해면강(Calcacea) 9종, 육방해면강(Hexactinellida) 2종, 보통해면강(Demospongiae) 114종 등 모두 125 종이 보고되어 있으나 미보고 혹은 미분류 종이 많아 실제로는 600 종을 상회할 것으로 추정되고 있다(심정자, personal commun.).

해면동물은 그 종류 및 서식 환경의 다양함과 채집의 용이함으로 인하여 해양천연물 연구의 초기부터 많은 주목을 끌어 왔다. 더욱이 초기에 발견된 해면의 천연물 중에서 생리활성 물질의 출현빈도가 매우 높아 집중적인 연구의 대상이 되어 왔으며 그 결과 현재 모든 해양생물 중에서 천연물화학적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. '70-'80년대에 보고된 해양신물질 중 30% 이상이 해면동물로부터 추출되었으며 이는 동·식물을 포함한 전 해양생물중 단일 문(phylum)으로서는 단연 최대의 추출 빈도이다(Ireland, et al, 1988; Fig. 2-1). 해면동물의 중요성은 근래에 더욱 증가하여 '91-'94년에 보고된 연구 결과 중에서 45%가 이들의 대사물질에 대한 것이다(Table 2-1). 이러한 경향은 날이 갈수록 더욱 심화되고 있어서 해면동물이 해양 천연물에서 차지하는 비중은 지속적으로 증가하고 있다(Cheical Abstracts에 나타난 '96-'97의 연구보고 중에서 50%를 상회; 신종헌, personal commun.). 천연물연구 뿐만 아니라 이들과 다른 생물간의 화학적 생태에 대한 연구 또한 최근에 매우 활발히 이루어지고 있다(Paul, 1987; Pawlik, 1993).

해면동물의 천연물은 그 종류가 매우 다양하여 여러 생화학적 기원을 가진 물질들이 망라되어 있다(Fig. 2-2). 또한 천연물이 생리활성을 나타내는 비율도 여타 대부분의 해양생물의 대사물질에 비하여 탁월하게 높아 항암제, 항진균제, 항바이러스제, 효

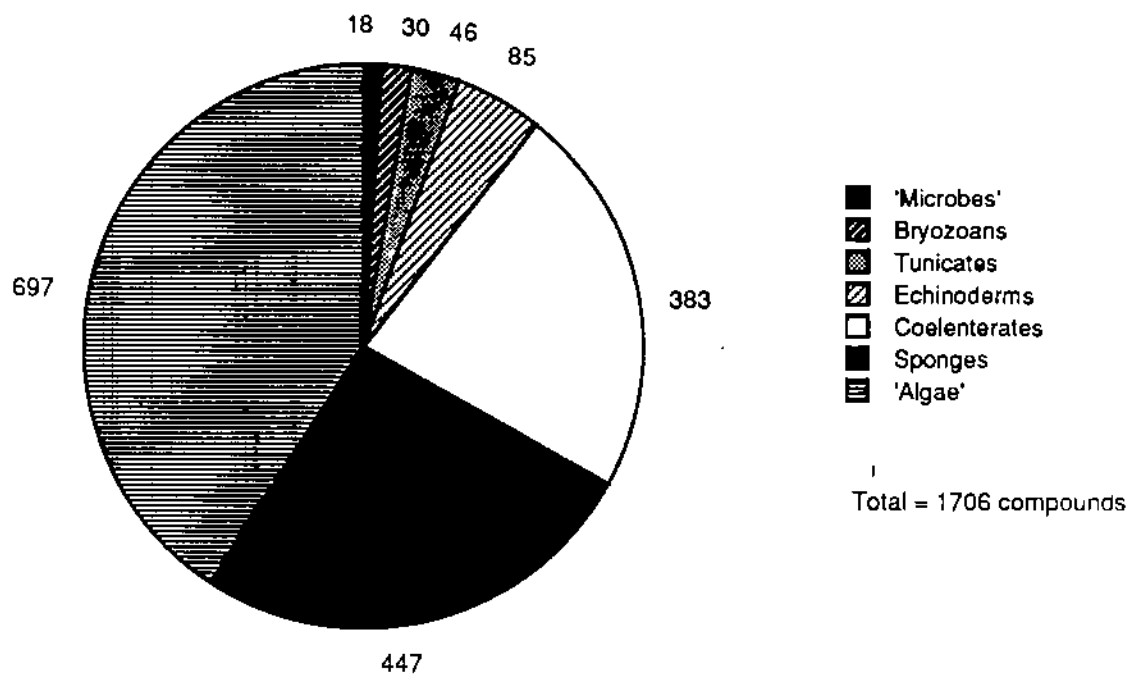


Fig. 2-1. Phyletic distribution of marine natural products.

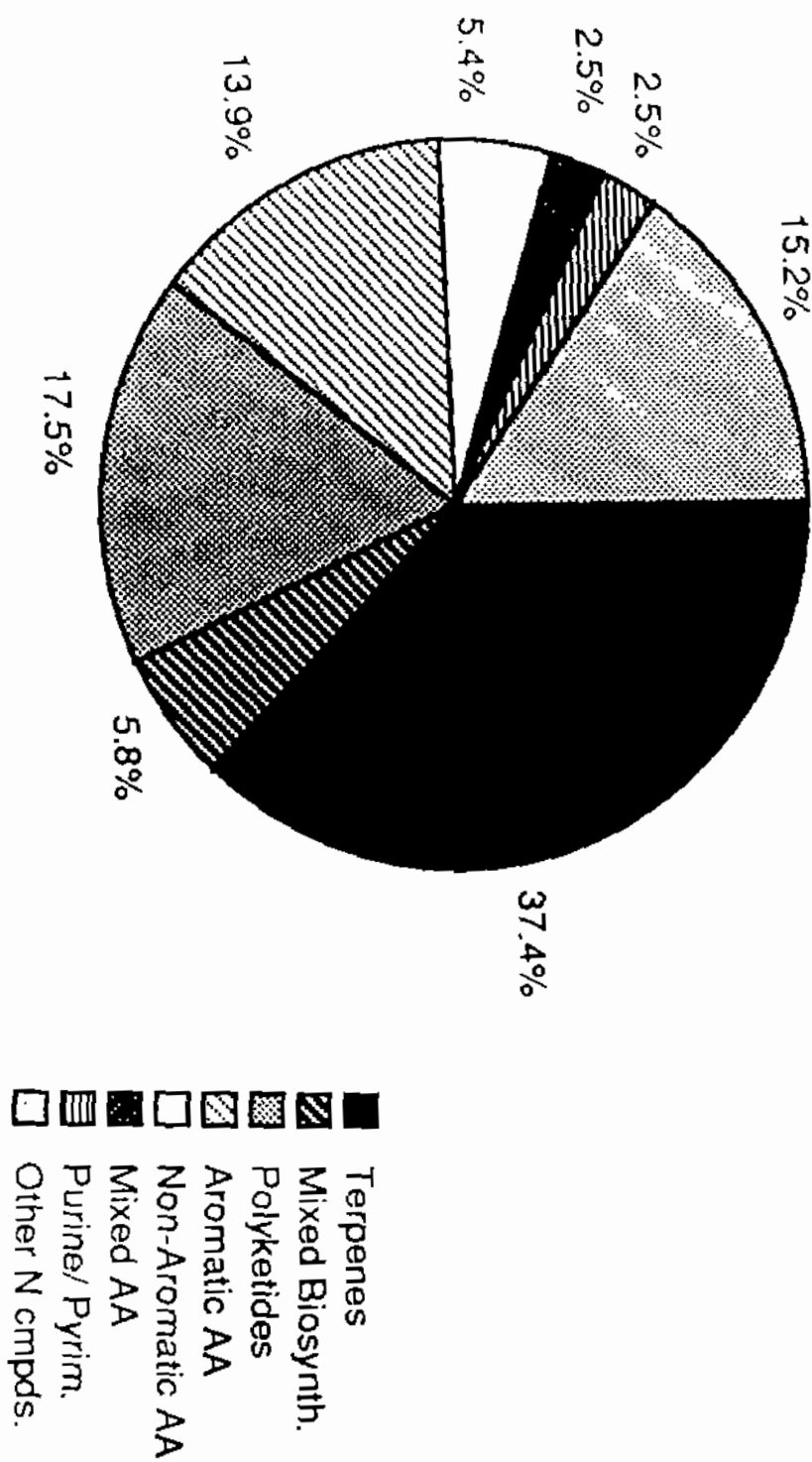


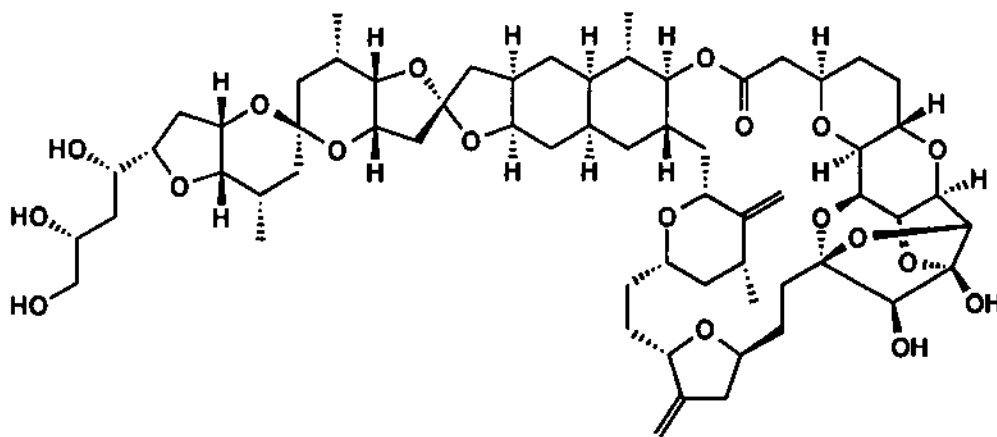
Fig. 2 2. Distribution of sponge metabolites by structural classes.

Table 2-3. Phyletic distribution of marine natural products - recent trend (1991-1994).

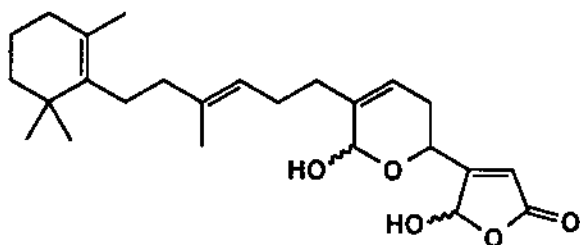
Organisms	Number of publications	%
Microbes(bacteria and fungi)	31	3.1
'Algae'(include cyanobacteria)	174	17.2
Bryozoans	10	3.1
Coelenterates	132	13.1
Echinoderms	49	4.8
Molluscs	79	7.8
Sponges	460	45.5
Tunicates	61	6.0
Total	1,011	100.0

(From Chemical Abstracts Selects - Novel Natural Products: Shin, personal commun.)

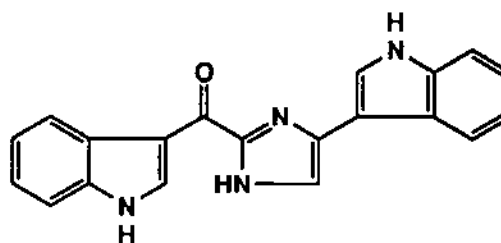
소저해제, 소염진통제, 면역억제제 등으로 개발중인 해양천연물에는 해면유래의 물질이 다수 포함되어 있다. 현재 해면의 천연물로서 특허를 획득하여 산업화의 가능성이 탐색되고 있거나 산업화 과정이 진행중인 물질중 대표적인 예를 살펴보면 *Halichondria okadai*와 *Lissodendryx* 속으로부터 분리된 항암물질 halichondrin B, *Luffariella* 속으로부터 분리된 소염, 진통물질 manoalide, *Topsentia* 속의 항암, 소염물질 topsentins, *Xestospongia exigua*로부터 분리된 항암물질 halenaquinone, *Jaspis* 속으로부터 분리된 항진균, 항암물질 jaspamide, *Discodermia dissoluta*로부터 얻어진 항진균, 항암 및 면역억제물질 discodermide와 discodermolide, *Theonella* 속의 항혈전물질 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, 1997; Fig. 2-3). 이들은 산업화의 성공 유무에 무관하게 신물질 개발을 위한 선도물질로서의 연구 가치가 대단히 높게 평가받고 있다. 해면유래 생리활성물질의 산업화와 관련하여 주목할 사실은 항암물질 halichondrin B의 대량생산을 위하여 미국의 NCI와 뉴질랜드의 벤처기업이 뉴질랜드의 남섬 부근의 해저에 이 물질을 생산하는 해면 *Lissodendryx*를 대량으로 양식하고 있다는 사실이다(Munro, personal commun.).



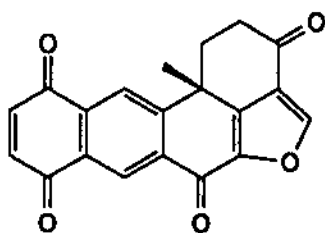
halichondrin B (*Halichondria okada*)
-antitumor



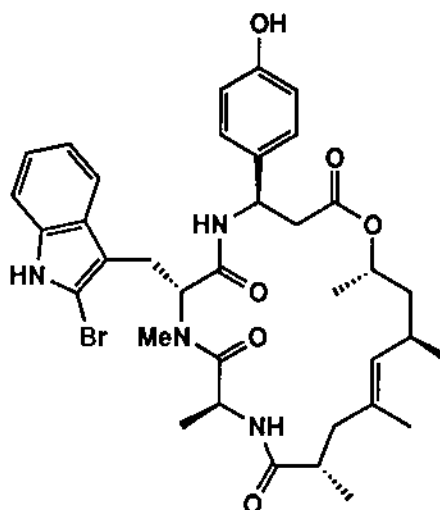
manoalide (*Luffariella* spp.)
- antiinflammatory, analgesic



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

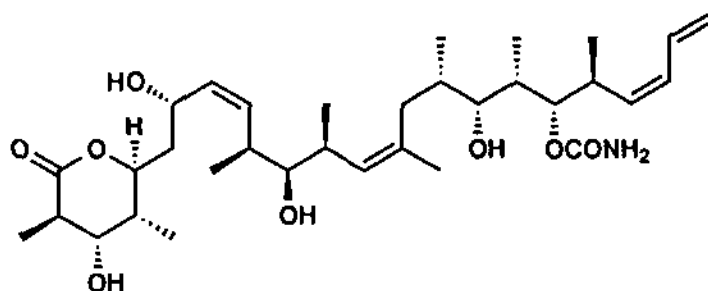
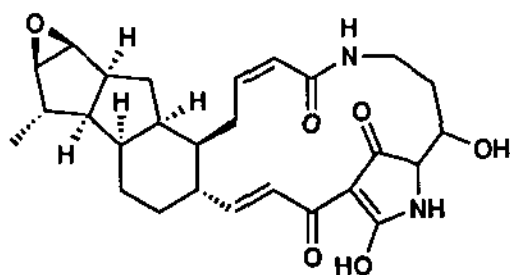


halenaquinone (*Xestospongia exigua*)
-antitumor

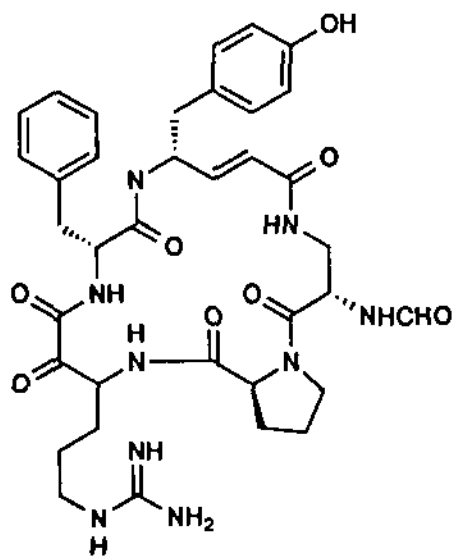


jaspamide (=jasplakinolide, *Jaspis* sp.)
- antifungal, cytotoxic

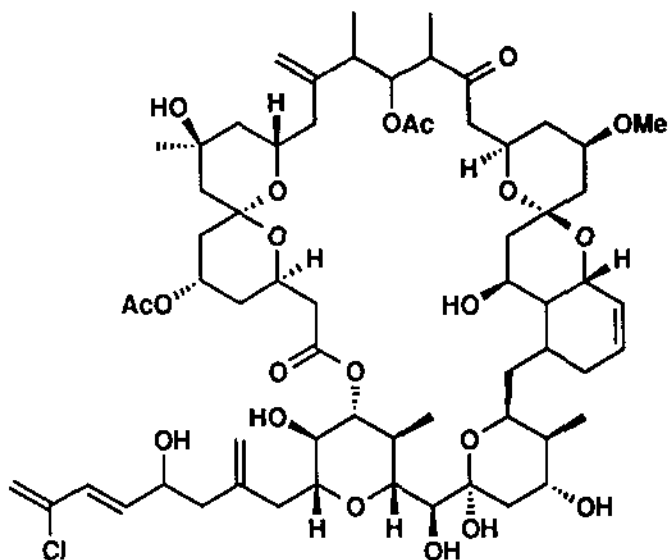
Fig. 2-3. Bioactive metabolites isolated from sponges.



Discodermide (top) and discodermolide(bottom) (*Discodermia dissoluta*)
-cytotoxic, antifungal



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



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

유용천연물 특히 신의약품 개발을 위한 선도물질로서의 신물질 탐색연구에 있어서의 해면동물의 중요성을 단적으로 드러내는 예는 현재 항바이러스제 혹은 항암제로서 각광을 받고 연구가 집중되고 있으며 상업적으로도 이용되는 ara-A, ara-C, acyclovir, AZT 등 modified nucleosides계 생리활성물질의 개발이 '50년대 후반 Caribbean Sea의 해면으로부터 추출된 세포독성물질 ara-T(spongothimidine)와 ara-U(spongouridine)에 기원하고 있다는 사실이다(Rinehart, 1988). 상기한 물질을 포함하는 여러 해면유래 신의약품 후보물질들 중에서 천연물 그 자체로 상업화에 성공하는 것은 비록 소수에 그친다 하더라도 이들의 특이한 구조와 강력한 생리활성 및 독특한 활성기작은 의약품이나 기타 산업적 소재의 개발에 많이 이용되고 있다. 뿐만 아니라 이들은 학문적인 면에서 유기화학, 생화학, 의·약학, 생물·생태학 등 여러 관련분야의 기초 및 응용연구에 막대한 기여를 하여 왔으며 미래에도 더욱 증대할 것이 확실시 된다(Fautin, 1988).

해면동물의 천연물은 3,500 종 이상이 알려져 있다. 이들은 구조적으로 매우 다양하여 terpenoids, steroids, amino acids, linear and cyclic peptides, polycyclic heteroaromatics, polyketides, nucleosides, mixed biogenetic products 등 모든 생합성적 기원에서 비롯된 물질들이 망라되어 있다(Fig. 2-2). 일개의 문(phylum)의 생물이 이렇게 다양한 천연물을 함유하고 있는 것은 육상과 해양을 막론하고 현존하는 생물에서는 유례가 없는 일이다. 뿐만 아니라 이들은 어떤 특정한 부류의 물질의 추출빈도가 다른 천연물을 압도하지 않고 각각의 생합성적 기원을 가진 물질들이 상당히 고른 추출빈도를 보여 준다. 일반적인 생물의 진화와 환경에 대한 생화학적 적용에 위배되는 이러한 현상은 불가피하게 해면의 천연물의 진정한 생산주체에 대한 의문을 야기시킨다(Haslam, 1986).

해면동물은 플랑크톤을 주로 섭취하므로 이들의 대사물질이 체내에 농축되어 있을 가능성이 매우 높다. 잘 알려진 예로서 강력한 DSP toxin인 okadaic acid는 해면 *Halichondria okadai* 에서 처음 추출되었으나 실제로는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 대사 물질임이 규명되었다(Faulkner, 1996). 또한 해면은 많은 경우에 다량의 착생 생물(epiphytes)이나 microalgae, eubacteria, cyanobacteria, fungi등을 체내에 다량으로 보유하고 있으므로(*Aplysina cavernicola*의 경우는 조직 부피의 38%가 bacteria) 추출된 물질이 해면의 고유한 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 미세조류의 대사 물질인가의 구분이 어렵다. 대표적인 예로 가장 연구가 많이 된 해면의 일종인 *Dysidea*속의 경우를 보면 terpenoids, chlorinated diketopiperazines, diphenyl ethers등 생합성적으로 관련이 전혀 없고 기원도 서로 상이한 물질들을 함께 보유하고 있는데 이들 중에서 최소한 일부의 천연물은 공생하는 광합성 생물에 의하여 합성된 것으로 추측되고 있으며 증거도 보고되고 있다(Unson & Faulkner, 1993; Faulkner, 1997). 또한 *Theonella swinhoei*의 천연물인 macrolides와 cyclic peptides는 모두 해면에 의하여 합성되지 않고 각각 공생하는 unicellular heterotrophic

bacteria와 filamentous heterotrophic bacteria에 의하여 합성된 사실이 밝혀졌다 (Bewley, et al, 1996). 이러한 점에 착안하여 생리활성 물질을 함유하는 해면으로부터 이들 미생물을 분리, 배양하여 산업적 가치가 높은 신물질의 대량 생산을 위한 시도가 최근에 매우 활발하게 진행되고 있다. 그러나 숙주와 선택적으로 공생하는 것이 분명한 이들의 독립적인 배양과 천연물 생산의 어려움으로 인하여 현재까지 가시적인 성과는 얻지 못하고있다.

해면동물의 대사물질에 대한 화학적 고찰은 본 연구진에서 이미 수행한 연구과제에서 매우 상세하게 다루었으므로 여기서는 요점과 새로이 알려진 사실만 간략히 살펴보면 다음과 같다(신 등, 1993). 먼저 비록 수 천 종의 천연물이 해면동물로부터 분리되었으나 대상 생물이 많아 수 백 종 이상의 해면이 화학적으로 연구되었고 시료도 지역적으로도 광범위하여 자료가 매우 분산되어 있다. 따라서 *Dysidea*, *Halichondria*, *Petrosia*, *Plakortis*, *Spongia*, *Xestospongia* 등 널리 알려진 수 개의 속을 제외하고는 발견된 천연물의 수가 적은(10 종 이하) 속이나 종이 많아 서로의 경향을 비교하기가 매우 어렵다. 분류학적으로 동일한 시료도 서식장소에 따라 다른 천연물을 함유하는 경우도 드물지 않다. 또한 많은 경우에는 목(order)이나 과(family) 보다는 속이나 종에 따른 특이한 물질들이 추출되었으므로 천연물의 특징을 생물의 분류학적인 친소관계에 의하여 분석하는 것이 어렵다. 더욱이 해면동물에 대한 분류체계가 확실하지 않아 여러 이론이 존재하고, 동일 시료에 대해서도 학자에 따라 목, 과, 혹은 속을 달리하는 예가 적지 않으므로 생물의 종류별로 천연물을 특징짓는 것도 어려움이 많다 (Bergquist & Wells, 1983).

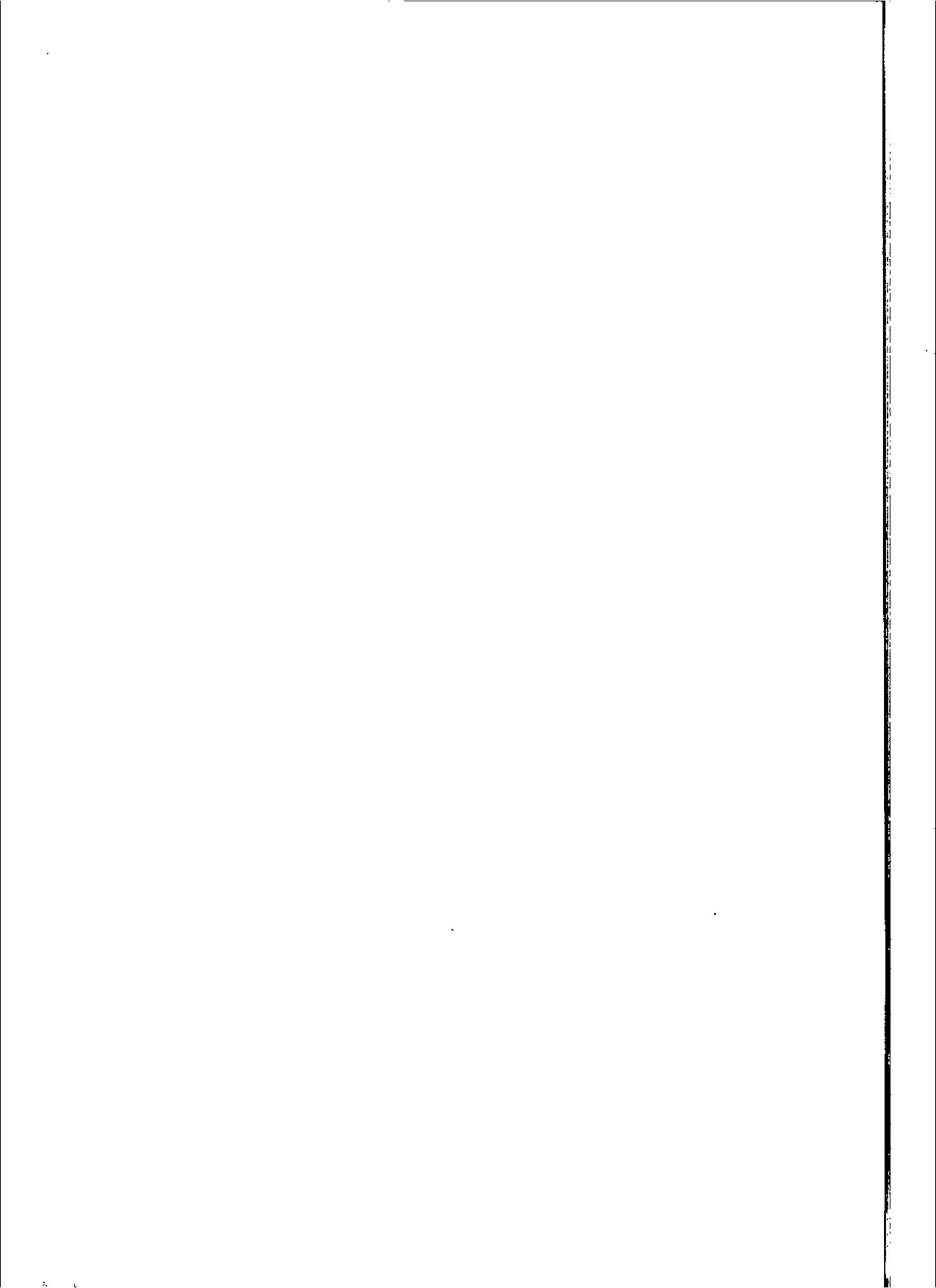
이러한 분류학상의 어려움과 천연물의 생산주체의 모호함을 감안하고 현재까지의 연구 결과를 개략적으로 살펴보면, 먼저 천연물 화학 연구는 해면의 여러 강 중에서 주로 Demospongiae강에 대하여 집중적으로 이루어져 왔다. 그러나 Demospongiae강에 속하는 해면들은 목, 과 혹은 속에 따라 함유하는 천연물의 종류가 매우 다름이 밝혀졌다. 먼저 해양 천연물 중에서 매우 중요한 위치를 차지하는 terpenoids와 terpene part가 포함된 mixed biosynthetic products는 여러 종류의 해면에서 매우 다양한 탄소 골격의 형태로 추출되었으나 특히 Demospongiae에 속하는 Dictyoceratida와 Dendroceratida의 두 목에서 가장 빈번히 추출되었다. 이들은 화학적 분류를 위한 지표로 이용된다(Bergquist & Wells, 1983). *Axinella*, *Acanthella* 및 *Hymeniacydon*속등 다른 목에 속하는 해면으로부터도 terpenoids가 다수 분리되었으나 이들은 거의 모두가 isocyanide, isothiocyanates, formides등 nitrogen part가 terpene에 결합된 특이한 형태의 물질들로서 Dictyoceratida와 Dendroceratida의 terpenoids와는 명확히 구분된다. 이러한 terpenoidal alkaloids의 nitrogen의 기원은 생합성 실험에 의하여 놀랍게도 무기 cyanide임이 밝혀졌다(Garson, 1993). Verongida

목으로부터는 다양한 형태의 bromotyrosine에서 유래한 alkaloids들이 집중적으로 추출되었는데 이들의 구조적인 특이성은 Dictyoceratida목의 한 과 (Verongiidae)로 전통적으로 분류되었던 이 종류의 해면이 근래 독립된 목으로 분류하게된 주된 이유이다(제 3장 제 7절 참조). Polyacetylenes은 여러 종류의 해면에 걸쳐서 추출되고 있으나 *Petrosia*, *Raspailia*, *Xestospongia* 등에서 특히 빈번히 발견된다.

해면동물에서는 다른 생물에서 찾아보기가 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 천연물 중에서 그 예가 극히 드문 quinolizidine alkaloids 및 그와 구조상으로 유사한 물질들을 보유하고 있으며 *Algelas*와 *Adocia*속으로부터 terpene과 adenine 혹은 guanidine이 결합된 매우 드문 형태의 mixed biogenetic products가 많이 추출되었다. 이 밖에도 여러 종류의 해면으로부터 구조의 분석이 지극히 어려운 복잡하고 독특한 형태의 물질들이 많이 추출되었다.

전기한 바와 같이 해면동물의 천연물은 3,500 종 이상이 알려져 있으나 현존하는 종 중에서 불과 5% 미만만이 연구되었으므로 신물질을 발견할 가능성은 여전히 매우 높다. 해면의 천연물은 구조적인 다양함과 강력한 생리활성으로 인하여 오랜 기간 해양천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지하고 있으며 관련분야의 연구에 미치는 영향 또한 지대하다. 더욱이 현재 다각도로 시도되고 있는 해면유래 천연물의 대량 생산과 상업화가 성공할 경우 해면은 해양천연물 뿐만 아니라 육상을 포함한 전 천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지할 것으로 기대된다. 따라서 현재는 물론 미래에도 상당기간 해양천연물 연구를 주도할 해면동물의 천연물에 관한 연구는 생리활성 선도물질의 발굴과 함께 국내의 천연물 연구수준의 향상과 연구대상의 확대에도 크게 기여할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 일반적인 연구 방법

본 연구의 범위는 시료의 채집, 중점연구대상 시료의 선정, 선정된 시료의 대량채집, 유기물질의 추출, 천연물의 분리, 신물질의 구조 결정, 생리활성의 측정 등 일반적인 천연물 연구의 영역을 망라하고 있다. 이 들 연구과정의 대부분은 자체적으로 수행하는 것을 원칙으로 하고 불가피한 경우는 해당분야의 국내외 전문가나 기관에 의뢰하였다. 본 연구의 대상, 접근방법 및 단위과정별 연구방법은 아래와 같다.

목표하는 천연물은 분자량 2,000 이하의 소형 유기물질로서 효소나 다당류, 단백질 등 거대분자는 제외하였다. 그러나 소형유기물질 중에서는 특정한 계열의 물질에 - 육상천연물연구에서 흔히 접근하는 방식인 saponins, steroids, lignans, polyphenols, flavonoids 등 한 종류의 물질을 중점적으로 연구- 국한시키지 않고 생리활성이 있는 물질을 모두 포함시켰다. 해면동물 시료는 특정한 강(Class)나 목(Order)에 구애받지 않고 스킨스쿠바 다이빙으로 채집이 가능한 천해(수심 0-35 m)에 서식하는 모든 시료를 대상으로 하였다. 시료의 채집대상 지역은 우리 나라의 제주도, 거문도, 백도, 울릉도 등 남해 및 동해안 도서 주변의 경성저질과 남극의 King George섬 연안, Guam과 Pohnpei 등 열대태평양의 도서 등이다. 채집된 시료의 동정은 국내의 시료는 한남대학교 자연사박물관에 의뢰하였고 국외 시료는 British National Museum과 University of Auckland에 의뢰하였다. 생리활성은 일반적인 활성인 항진균, 세포독성 및 항산화 활성을 일차적으로 측정하고 reverse transcriptase(RT), Na⁺/K⁺-ATPase, PLA₂, TOPO-I 등의 효소에 대한 저해 활성은 측정체계의 구축이 진행되는 정도에 따라 본 연구과제에서 함께 다루었다. Farnesyl protein transferase(FPT), cholesteryl ester transfer protein(CETP) 등은 생명공학연구소에 의뢰하였으며 항바이러스와 항암 활성(*in vivo*)은 이 분야의 전문 연구기관인 화학연구소 스크리닝센터와 미국의 National Cancer Institute에 각각 의뢰하였다.

천연물의 추출과 분리는 해양천연물화학에서 주로 운용되는 일반적인 크로마토그래피 방법을 이용하였다. 즉 시료로부터 천연물을 추출하는 데는 dichloromethane과 MeOH, acetone 혹은 이들의 혼합액을 주로 이용하였으며 조 추출물은 Modified Kupchan's Scheme을 이용하여 염의 제거와 극성에 따른 분획을 하였다. 각각의 분획에 대하여는 ¹H NMR과 생리활성의 추적을 하여 이차대사물질이 포함된 분획을 선정한 후에 각각의 해당 분획에 대하여 silica 혹은 reversed-phase vacuum flash chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, gel-permeation chromatography, centrifugal countercurrent chromatography 등의 분리 방법을 혼합하여 천연물을 일차적으로 분리하였다. 물질의 최종분리 및 정제는 다양한 column을 이용한 silica 혹은 reversed-phase

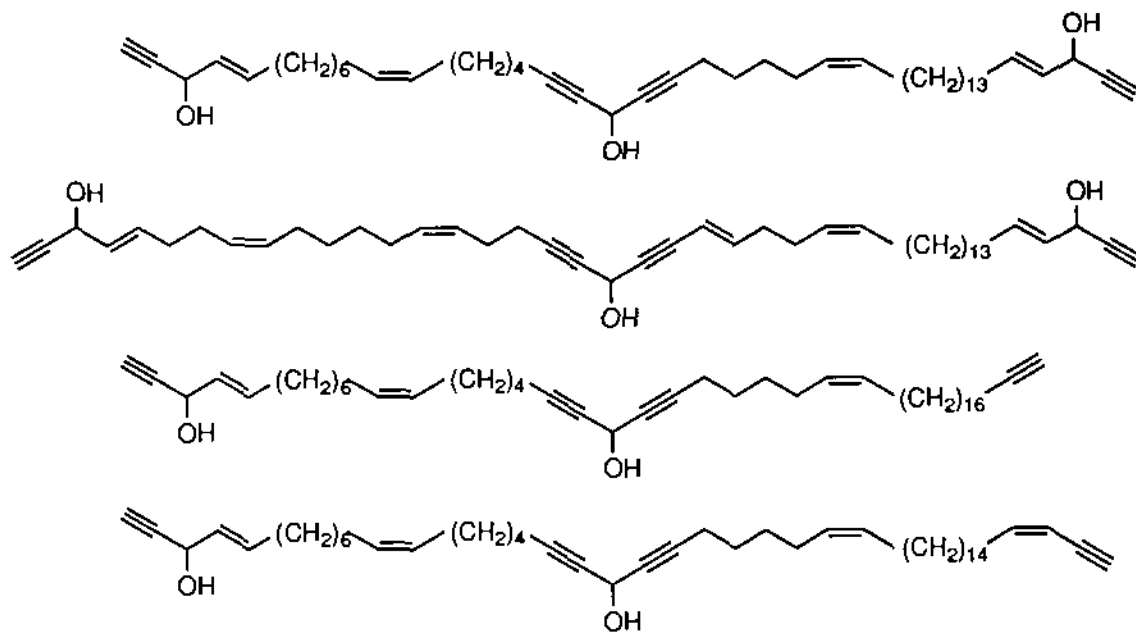
HPLC를 반복적으로 사용하여 완료되었다. 분리된 천연물의 구조는 ^1H -, ^{13}C -, ^{15}N -NMR, ^1H -decoupling, DEPT, ^1H selective INEPT 등 일차적인 NMR자료와 ^1H COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HETCOR, HMQC, HSQC, HMBC, HMQC-TOCSY 등 multidimensional NMR 실험과 IR, UV, optical rotation, CD, energy dispersive spectroscopy 등 분광자료의 종합적인 해석과 고해상 질량분석(기초과학지원센터와 California대학에 의뢰)자료에 의하여 이루어 졌다. 분광자료의 해석만으로 신물질의 구조 결정이 어려운 경우에는 chemical degradation, total synthesis 등 유기화학적 방법에 의하여 입체 구조를 규명하였다. 본 연구에서 분리된 모든 천연물은 이러한 분광학과 유기화학적인 방법으로 구조가 완전히 결정되었으므로 X-선 결정구조분석은 시도되지 않았다. 구조 규명이 완료된 물질에 대해서는 본 연구진 자체적으로 정량적인 생리활성을 측정하였으며 우수한 물질은 국내의 전문기관에 정밀한 활성과 기작에 대한 규명을 의뢰하였다.

제 2 절 해면 *Petrosia* sp. 의 대사물질

1. 서 론

1995년 11월 거문도와 백도부근의 수심 20 - 25 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집된 해면시료 95B-8은 길이 20-40 cm, 폭 2-3 cm 정도로서 우리나라 연안의 해면으로서는 대형에 속하였다. 이 시료의 색깔은 바깥쪽은 연한 고동색 내지 핑크색이고 안쪽은 베이지색이며 형태는 판상으로서 딱딱하고 잘 부러졌다. 이 해면은 처음에 *Strongylophora* sp.로 생각되었으나 그후 국내의 분류전문가에 의뢰하여 spicule의 형태를 관찰한 결과 *Petrosia corticata*와 유사한 형태적 특징을 갖고 있는 것이 밝혀졌다. 그러나 현미경으로 미세구조를 정밀 분석한 결과 *P. corticata*에서는 strongylote 형태의 spicule만 존재하는데 비하여 이 시료에는 oxea형태의 spicule도 함께 존재한다는 점이 발견되었다. 따라서 이 시료는 *Petrosia* 속에 속하는 미분류종으로 최종적으로 결론지워졌다(Seo, et al. 1998). 이 시료의 표본은 현재 한남대학교 부설 자연사박물관의 해면동물 부문에 보존 중이다(등록번호 Por. 27).

알려진 해양천연물에 대한 문헌조사에 의하면 현재까지 *Petrosia* 속에서 분리된 천연물들중에 가장 널리 알려지고 종류가 다양한 것은 polyacetylene계 화합물이다(Fig. 3-1). 이들은 carbon chain이 길고 거의 대부분이 unbranched 되어 있으며 탄소의 수가 30 혹은 그 이상이어서 일반적으로 분자량이 크다. 대표적인 예를 살펴보면 지중해에 서식하는 *Petrosia ficiformis*에서 petroformynes 1-8이 분리되었으며 *Petrosia*



petroformynes 1 - 4 (from top to bottom)

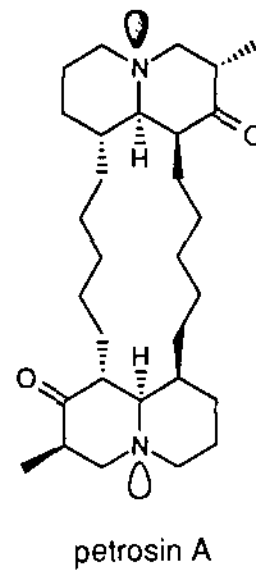
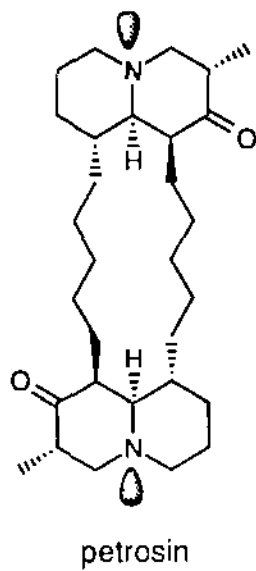
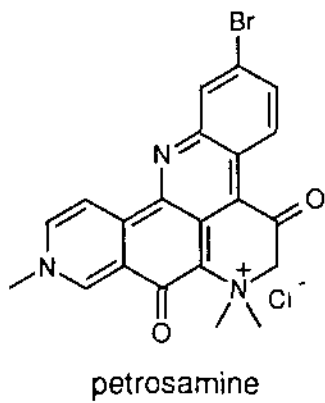


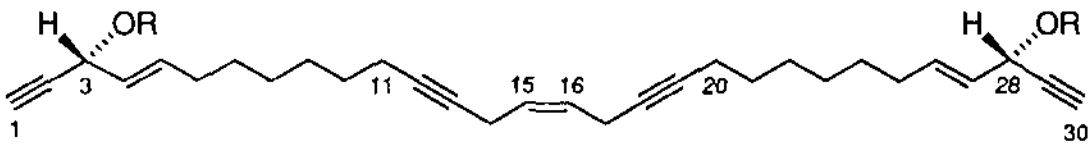
Fig. 3-1. Metabolites of sponges of the genus *Petrosia*.

sp.로부터 petrosynol과 petrosynone등이 분리되었다(Cimino, et al, 1989; 1990; Fusetani, et al, 1983; 1987). Petrosynol과 petrosynone은 1 μ g/mL의 농도에서 sea urchin *Pseudocentrotus depressus*의 수정란의 세포분열을 억제하였으며 항미생물 및 starfish egg assay에서도 활성을 보여 주었다. Polyacetylene을 제외한 다른 계열의 화합물로는 bis-quinolizidine alkaloid 유도체들이 알려져 있다. 대표적인 물질로는 *P. seriata*에서 추출된 petrosin이 보고되었다. 이 물질은 oxoquinolizidine functionality를 가지고 있으며 vasodilative activity와 어류독성이 있음이 알려졌으며 *Vestospongia* sp.에서도 동일한 물질이 분리되었다(Braekman, et al, 1982; 1984; Kobayashi, et al, 1989). 또한 카리브해에서 채집한 *Petrosia* sp.로부터 polycyclic heteroaromatic pigment인 petrosamine이 분리되었으며 다른 해양고착생물의 대사물질들과 상당히 유사하기 때문에 이 해면에 공생하는 미생물에 의해서 만들어 진 것이 아닌가 추측되어 진다. 이 물질은 특이하게 THF 용매 하에서는 녹색을 나타내나 수용액 상태에서는 보라색을 나타낸다(Molinski, et al, 1988).

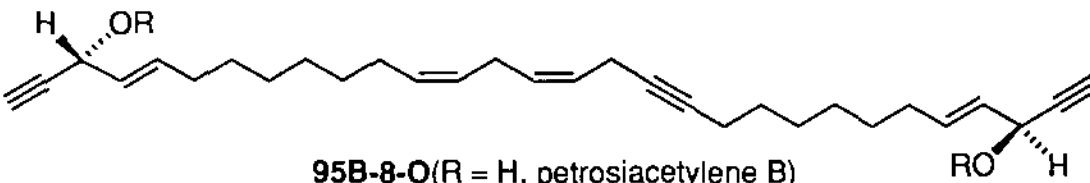
상기한 바와 같이 본 연구에서 채집된 시료 95B-8은 그 생물학적 분류군이 천연물 화학적으로 우수함이 외국의 연구사해에서 이미 입증되었을 뿐만 아니라 채집된 시료의 양과 유기 조추출물에 대한 TLC분석, brine shrimp 치사율(LD₅₀ 20 ppm)등의 생리활성도 측정결과가 다른 해면에 비하여 상대적으로 우수하였다. 더욱이 이 종류의 해면이 우리 나라 근해에 널리 번식하므로 시료의 원활한 공급이 용이하다는 사실 등을 종합하여 연구의 일차적인 대상으로 선정하였다.

본 연구에서는 *Petrosia* sp.로부터 구조적으로 서로 상이한 세가지 계열에 속하는 15종의 acetylenes 및 polyacetylenes계 천연물을 분리하였으며 NMR 등 분광학적 방법과 유기합성을 통하여 평면구조와 함께 절대배열을 포함하는 입체구조도 완벽하게 규명하였다. STN database를 이용한 문헌조사 결과 이들 중에서 11종의 물질이 지금까지 알려지지 않은 신물질로 판명되었다. 해면동물로부터 분리된 여러 천연물 중에서 acetylenes와 polyacetylenes는 그들의 발견빈도와 chain 길이, 작용기 등 구조적 다양함과 무한대에 가까운 다양한 생리활성으로 인하여 해면의 polyketides계 천연물 중에서 가장 중요한 위치를 차지하고 있다(Faulkner, 1996; 1997; Fu, et al, 1997; Mancini, et al, 1997; Tsukamoto, et al, 1997; Umeyama, et al, 1997; Guo, et al, 1998; Seo, et al, 1998).

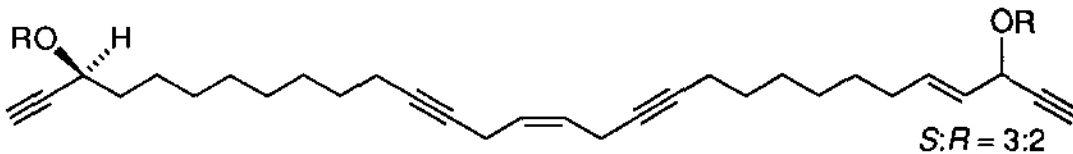
본 연구에서 발견된 천연물들을 구체적으로 살펴보면 먼저 petrosiacetylenes A-D로 명명한 4종의 C₃₀ polyacetylene계 신물질을 분리하였다(Fig. 3-2). 이들은 해면의 polyacetylenes 중에서도 구조적으로 매우 특이한 부류에 속하며 유사한 물질로는 petrosynol과 일본의 해면 *Adocia* 속에서 분리된 adociacetylenes가 존재할 뿐이다(Faulkner, 1997; Kobayashi, et al, 1996). 이들 중에서 petrosiacetylenes A와 C는 강한 brine-shrimp 독성과 중성도의 세포독성 및 대단히 강한 RNA 분해능을 나타내었다. 또한 이들은 reverse transcriptase(RT), PLA₂, Na⁺/K⁺-ATPase 등의 효소에 대한 저



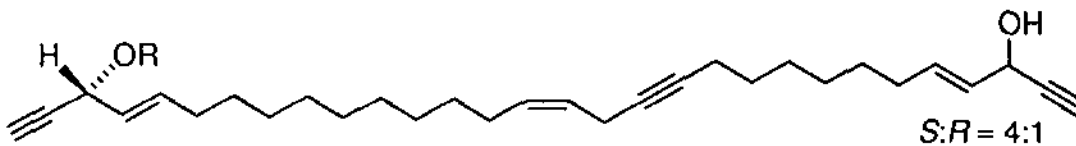
95B-8-H(R = H, petrosiacetylene A)
95B-8-HS(R = (*S*)-MTPA)
95B-8-HR(R = (*R*)-MTPA)
95B-8-HX(R = (*S*)-2-methylbutyrate)



95B-8-O(R = H, petrosiacetylene B)
95B-8-OS(R = (*S*)-MTPA)
95B-8-OR(R = (*R*)-MTPA)



95B-8-N(petrosiacetylene C, a mixture of
 -Na(R = H, 28*S*) and -Nb(R = H, 28*R*)
95B-8-NaS(R = (*S*)-MTPA, 28*S*), **95B-8-NbS**(R = (*S*)-MTPA, 28*R*)
95B-8-NaR(R = (*R*)-MTPA, 28*S*), **95B-8-NbR**(R = (*R*)-MTPA, 28*R*)



95B-8-P(petrosiacetylene D, a mixture of
 -Pa(R = H, 28*S*) and -Pb(R = H, 28*R*)
95B-8-PaS(R = (*S*)-MTPA, 28*S*), **95B-8-PbS**(R = (*S*)-MTPA, 28*R*)
95B-8-PaR(R = (*R*)-MTPA, 28*S*), **95B-8-PbR**(R = (*R*)-MTPA, 28*R*)

Fig. 3-2. Structures of petrosiacetylenes A-D and synthetic derivatives.

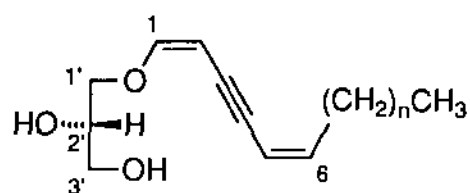
해능을 나타내었다. 이 연구결과는 최근 국제학술지에 게재되었으며 국내특허가 출원되었다(Seo, et al, 1998; Shin, et al, 97-62420).

또한 glycerol의 결가지에 선형의 acetylene이 ether 형태로 결합된 물질 10 종을 분리하였으며 분광학적 방법과 유기 전합성에 의하여 이들의 구조를 규명하였다. 문헌 조사 결과 이들 중에서 4종의 물질은 지중해에 서식하는 해면 *Raspailia pumila*와 *R. ramosa*의 대사물질로 보고된 raspailynes B1, B2, isoraspailynes B, B1 등으로 밝혀졌다(Guella, et al, 1986; 1987a; 1987b). 이들과 함께 분리된 6종의 신물질은 petroraspailynes A1, A2, A3, B1, B2, B3로 명명되었다(Fig. 3-3). 생리활성 측정 결과 이들은 인체의 백혈병 세포인 K562에 대하여 독성을 나타내었으며 효소 topoisomerase I에 대하여 저해활성을 나타내었다. 이들과 함께 선형의 C₁₂ 골격으로 이루어져 있으며 methyl ester와 yneol-ene 작용기를 갖고 있는 신물질이 1종 분리되었다. 본 연구진에 의하여 petrynol로 명명된 이물질의 구조는 분광학적 방법으로 규명되었으며 특히 비대칭 탄소의 절대배열은 MTPA를 이용한 modified Mosher's method에 의하여 밝혀졌다 (Ohtani, et al, 1991; Bernart, et al, 1994). 그러나 특이한 구조에도 불구하고 이 물질은 세포독성이나 기타의 생리활성을 나타내지 못하였다. Petroraspailynes와 petrynol의 구조 및 생리활성에 관한 연구결과는 최근 국제학술지에 게재되었다 (Seo, et al, 1998).

2. Petrosiacetylenes의 분리 및 구조 결정

냉동하여 보관한 시료를 MeOH로 반복해서 추출한 후에 다시 dichloromethane으로 반복 추출하였으며 마지막으로 MeOH과 dichloromethane의 1:1 혼합용액으로 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물을 다시 dichloromethane과 물을 이용하여 분배하였으며 dichloromethane층은 다시 85% aq. MeOH 층과 hexane으로 다시 분배하였다. 각각의 분획에 대한 brine shrimp lethality 측정 결과 hexane층은 LD₅₀ 410 µg/mL을 보였으며 aq. MeOH 층은 42 µg/ml을 보였다. 이에 따라 aq. MeOH 층의 용매를 제거하고 얻어진 조추출물에 대하여 C₁₈ 고속 감압 크로마토그래피를 실시하였다. 용매로는 30% aq. MeOH, 20% aq. MeOH, 10% aq. MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc를 순서대로 용출하였으며 이렇게 얻어진 분획(fraction, fx)들에 대해 brine shrimp lethality를 측정한 결과 용출한 순서대로 133, 3.3, 0.3, 57, 88, 200 >1000 µg/ml의 LD₅₀를 보였다. 또 ¹H NMR 스펙트럼을 측정한 결과 특징적인 2차 대사물질이 20% aq. MeOH와 10% aq. MeOH 분획에서 존재하고 있다는 징후가 관측되었다. Proton NMR 측정결과와 brine shrimp lethality 결과를 종합해 볼 때 유의한 20% aq. MeOH와 10% aq. MeOH 분획에 대해서 C₁₈ reversed-phase HPLC로 천연물을 분리하였다.

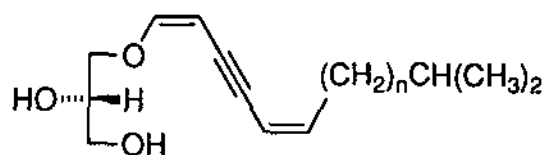
무색의 sticky material로 분리된 물질 petrosiacetylene A(95B-8-H)의 분자식은



95B-8-E ($n = 7$, raspaillyne B1)

95B-8-D ($n = 6$, raspaillyne B2)

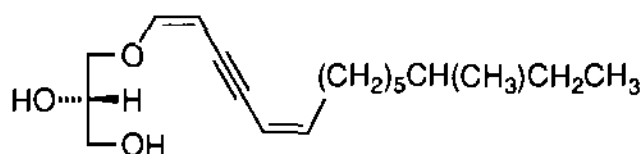
95B-8-C ($n = 5$, petroraspaillyne A1)



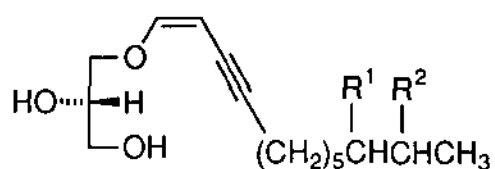
95B-8-F ($n = 6$, isoraspaillyne B)

95B-8-U ($n = 5$, isoraspaillyne B1)

95B-8-L ($n = 4$, petroraspaillyne A2)



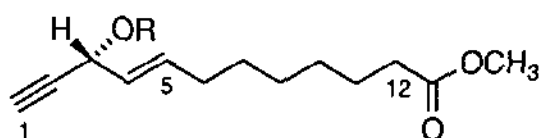
95B-8-K (petroraspaillyne A3)



95B-8-S ($R^1 = R^2 = H$,
petroraspaillyne B1)

95B-8-T ($R^1 = CH_3$, $R^2 = H$,
petroraspaillyne B2)

95B-8-G ($R^1 = H$, $R^2 = CH_3$,
petroraspaillyne B3)



95B-8-A ($R = H$, petrynyl)

95B-8-AS ($R = (S)$ -MTPA)

95B-8-AR ($R = (R)$ -MTPA)

Fig. 3-3. Structures of acetylenic enol ethers of glycerol and petrynyl.

HRDCIMS(high-resolution desorption chemical ionization mass)에 의해서 $C_{30}H_{40}O_2$ 로 결정되었다(Fig. 3-4). 그러나 고분별능 질량분석 결과에 의하면 모두 30개의 탄소 peak가 나타나야 됨에도 불구하고 ^{13}C NMR 스펙트럼에서는 15개의 탄소 peak밖에 나타나지 않았다(Fig. 3-5). 이는 물질 **95B-8-H**의 구조가 C_2 -대칭성을 가지고 있음을 의미하는 것으로 해석되었다. 이 물질의 탄소는 ^{13}C NMR 스펙트럼과 DEPT 실험에 의하여 3개의 quaternary carbons과 5개의 methine carbons, 그리고 7개의 methylene carbons으로 나타났다(Fig. 3-6). 이들은 ^{13}C NMR의 chemical shift 값을 고려해 보면 7개의 aliphatic methylene(δ 32.07, 29.08, 28.90, 28.86, 28.84, 18.95, 17.41), 2개의 oxygenated methine(δ 62.78, 52.56)과 이중결합에서 유래된 3개의 methine(δ 134.62, 128.70, 126.72)으로 해석되었다. 해석하기 어려운 부분은 δ 70-90에 나타난 3개의 quaternary(δ 83.58, 80.65, 77.93)와 1개의 methine(δ 74.20) carbon이었다. 이들의 chemical shifts는 전형적인 oxygenated carbon에 해당하였으나 signal의 크기가 매우 작고 물질이 별로 큰 극성을 띄고 있지 않은 점을 고려하여 acetylene carbons에서 유래된 것으로 생각되었다. 1H NMR에서 1개의 acetylene proton(δ 2.54, d, $J = 2.5$ Hz)과 1개의 carbinol proton(δ 4.81, ddd, $J = 5.9, 2.5, \text{ and } 1.0$ Hz)이 발견된 것이 이러한 해석을 강력히 지지하는 증거이다(Fig. 3-7).

Petrosiacetylene A의 부분구조는 1H - 1H COSY와 HMQC 및 HMBC 실험에 의해 규명되었다(Fig. 3-8 and 3-9). 특히 이 물질의 특징적인 부분구조인 terminal enol-yne과 symmetric allylic ene-diyne 구조는 이 부분에 해당하는 여러 개의 2-, 3-bond H-C correlation으로 명확히 결정되었다. 대칭구조를 가진 물질에서 양쪽의 종말점과 중심부분을 이루는 작용기가 정의되었으므로 이들을 서로 연결하는 것은 의심할바 없이 긴 methylene chain이었다. 이 해석은 질량분석에서 나타난 파편(fragments)에 대한 해석으로 입증되었다. 이와 같이 petrosiacetylene A(**95B-8-H**)의 구조는 대칭구조를 가진 C_{30} tetraacetylenic diol로 결정되었다(Fig. 3-2). 이 물질에 존재하는 세 개의 이중결합 중에서 C-4와 C-26 이중결합의 geometry는 수소 사이의 vicinal coupling constant($J_{4,5} = J_{26,27} = 15.4$ Hz)에 의하여 E로 결정되었으며 대칭의 중심에 위치하여 coupling constant를 측정할 수 없는 C-15 이중결합은 allylic carbon의 chemical shift(δ 17.41)로부터 Z geometry로 지정되었으며 유사한 물질인 petrosiacetylene D의 구조로부터 확인되었다 (Ariello, *et al.*, 1992). 두 개의 비대칭 탄소(C-3, C-28)의 입체구조는 Mosher method에 의하여 결정되었으며 다른 물질과 함께 이 후에 다룬다.

유사한 대사물질인 petrosiacetylene B(**95B-8-O**)가 oily material로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(DCIMS) 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터분석에 의하여 $C_{30}H_{42}O_2$ 로 결정되었다(Fig. 3-10 and 3-11). 이 물질의 분광 데이터는 **95B-8-H**와 대단히 유사하였으나 가장 큰 차이점은 15개의 탄소대신 30개의 탄소에 해당하는 signal이 ^{13}C NMR 상에서 뚜렷이 나타난 점이다. 또한 ^{13}C NMR 상에서 물질 **95B-8-H**에 존재하던 삼중결합 중 하나가 줄어들 대신에 새로운 이중결합의 peak들(δ 127.13과 130.56)이

나타났다는 것이다. 이에 대응하는 변화가 ^1H NMR 스펙트럼에서도 관찰되어 δ 5.31 (1H, br dd, $J = 10.7, 6.4$ Hz)과 5.36(1H, m)에 새로운 olefinic proton들이 나타났다 (Fig. 3-12). 따라서 petrosiacetylene B는 petrosiacetylene A에 존재하던 3개의 삼중 결합중에서 가운데에 위치한 하나가 환원되어 이중결합으로 변한 polyacetylene 유도체로 생각되었으며 이로 인하여 분자의 대칭성이 깨어진 물질로 생각되었다. 이 새로운 이중결합의 위치는 ^1H - ^1H COSY와 HMQC 실험에 의하여 C-12와 C-13으로 결정되었다(Fig. 3-13 and 3-14). 이를 지지하는 주요한 증거는 TOCSY 실험에서 두 개의 allylic protons(δ 2.06, H-11; δ 2.02, H-6)을 함께 포함하는 correlation이 발견된 점이다. 또한 다른 모든 부분구조의 존재도 동일한 2D NMR 실험에 의하여 확인되었다. 새로운 이중결합의 geometry는 coupling constant($J = 10.7$ Hz)에 의하여 Z로 결정되었다. 그러므로 이 petrosiacetylene B는 petrosiacetylene A의 중앙에 위치한 삼중결합 중의 하나가 환원된 유도체로 결정되었다(Fig. 3-2).

Petrosiacetylene C(95B-8-N)이 무색의 oil로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 DCIMS와 ^{13}C NMR에 의해서 $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 3-15 and 3-16). 이 물질의 NMR 스펙트럼은 약간의 차이점을 제외하고는 95B-8-H와 대단히 유사하였다. 먼저 ^{13}C NMR에서 이중결합을 나타내는 4개의 methine peak(δ 134.41, 128.40, 126.47, 126.43)와 16개의 upfield methylene carbons의 signal들 및 2개의 oxymethine peak들, 그리고 acetylene carbons에서 유래된 2개의 methine과 6개의 quaternary carbons이 발견되었다. 두 물질의 ^{13}C NMR 자료를 세밀히 비교해 본 결과 95B-8-H의 3개의 이중결합 중의 하나가 95B-8-N에서는 포화되어 있음이 드러났다. 이에 상응하는 변화가 ^1H NMR에서 발견되었다. 먼저 물질 95B-8-H에서 구조의 대칭성으로 인하여 ^1H NMR스펙트럼이 비교적 단순하였는데 비하여 95B-8-N에서는 대단히 복잡한 양상을 드러내었다. 즉 terminal acetylene에서 유래된 2개의 methine proton들이 δ 2.54(1H, d, $J = 2.0$ Hz)와 2.44(1H, d, $J = 2.0$ Hz)에서 나타났으며 2개의 oxymethine proton들이 δ 4.82 (1H, br d, $J = 6.2$ Hz), 4.35(1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 2.0$ Hz)에서 발견되었다(Fig. 3-17). 또한 long-chain aliphatic proton들이 훨씬 복잡한 pattern으로 나타났다. 따라서 95B-8-H의 양쪽 끝에 존재하는 두 개의 yneol-ene 중의 하나가 95B-8-N에서는 단순한 yneol로 변화한 것이다. 이 해석은 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC 등의 실험에 의해서 규명되었다. 따라서 petrosiacetylene C는 petrosiacetylene A의 C-4 이중결합이 환원된 유도체로 결론 내려졌다(Fig. 3-2).

다른 유사한 대사물질인 petrosiacetylene D(95B-8-P)가 oil 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 고분별능 질량분석(DCIMS) 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터분석에 의하여 $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 3-18 and 3-19). 이 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 95B-8-O와 대단히 유사하였다. 유일한 차이점은 ^1H NMR 스펙트럼상에서 이중결합 (95B-8-O의 δ 5.31과 5.36)에 해당되는 vinyl proton들이 새로운 upfield methylene proton들로 대체되었으며 이와 함께 δ 2.77에 존재하던 methylene proton들이 사라지고

δ 1.99에 새로운 methylene proton들이 나타난 것이었다(Fig. 3-20). 상응하는 변화가 ^{13}C NMR에서도 발견되어 95B-5-0에 존재하던 1개의 이중결합(δ 127.13과 130.56)에 해당되던 methine carbon들이 사라지고 새로운 methylene carbon들이 추가적으로 발견되었다(Fig. 3-19). 따라서 대사물질 95B-8-P는 95B-8-0에 존재하던 하나의 이중결합이 환원된 형태의 polyacetylene 유도체로 결정되었으며 존재하는 부분구조는 ^1H - ^1H COSY와 HMQC 실험에 의하여 결정되었다. 남아있는 이중결합의 geometry는 δ 2.87(2H, dt, $J = 5.9, 2.9$ Hz)와 δ 1.99(2H, dt, $J = 6.4, 7.3$ Hz)에 나타난 allylic proton들을 각각 irradiation하여 olefinic protons 간의 coupling constant를 측정한 결과 10.7 Hz로 확인되었으므로 *Z* configuration으로 결정되었다. 따라서 petrosiacetylene D는 petrosiacetylene A의 C-12 이중결합이 완전히 포화된 유도체로 결론 지워졌다(Fig. 3-2).

Petrosiacetylenes A-D는 모두 동일한 위치(C-3, C-28)에 비대칭 탄소(asymmetric carbon center)를 갖고 있다. Secondary alcohol로 이루어진 이들의 입체구조의 결정은 일반적으로 CD chirality method로 가능한 것으로 알려져 있으나 수 년전 petrosiacetylene과 같은 yneol-ene에는 이 방법의 적용이 옳바르지 못하다는 증거가 발견되었다(Bernart, *et al*, 1994). 따라서 petrosiacetylene의 입체구조는 MTPA (methoxy- α, α, α -trifluoromethylphenylacetic acid)를 이용하여 Kusumi와 Kakisawa가 개발한 modified Mosher's method의 적용이 시도되었다 (Ohtani, *et al*, 1991; Shin, *et al*, 1995). (+)-와 (-)-MTPA 혹은 이들의 chloride를 이용하여 유기물질의 ester나 amide(secondary amine의 경우)를 합성하여 ^1H NMR 상에서 인접한 수소의 chemical shifts의 차를 비교하여 비대칭 탄소의 입체구조를 결정하는 이 방법은 유기물질의 3차원 구조에 영향을 심하게 받는 제약에도 불구하고 최근 그 이용이 급증하는 실험방법이다.

소량의 petrosiacetylene A(95B-8-H)를 dry pyridine에 녹인 후 (+)-와 (-)-MTPA chlorides와 각각 반응시킨 후 합성물의 HRMS와 ^1H NMR spectrum을 얻었다(Fig. 3-21). 그러나 놀랍게도 두 물질의 spectrum이 서로 상이하여야 함에도 불구하고- (*S*)-MTPA ester(95B-8-HS)와 (*R*)-MTPA ester(95B-8-HR)의 ^1H NMR data는 완전히 일치하였다(Fig. 3-22 and 3-23). 더욱이 두 개의 terminal acetylenic protons H-1과 H-30이 δ 2.63(1H, d, $J = 2.4$ Hz), 2.59(1H, d, $J = 2.4$ Hz)로 서로 상이하게 나타났다. 이러한 현상에 대한 설명은 두 가지 즉 물질 95B-8-H가 3*R*, 28*S* (혹은 3*S*, 28*R*)의 입체구조를 가진 일종의 meso-compound 이거나 두 enantiomers(3*R*, 28*R*과 3*S*, 28*S*)의 1:1 racemic mixture로 만이 이해가 가능하였다. 후자의 경우를 입증하기 위하여 HPLC나 chiral GC로 수 차례 peak의 분리를 시도하였으나 항상 하나의 peak로만 분리되었다. 최종적으로 95B-8-H를 자체적으로 chiral center를 갖고 있는 (*S*)-2-methylbutyric acid와 반응시켜 물질 전체의 chirality를 증가시킨 ester (95B-8-HX)를 합성한 후에 동일한 분석을 하였으나 여전히 하나의 물질로만 분리되었다(Fig. 3-24). 따라서 petrosiacetylene A

는 3*R*, 28*S* configuration을 가진 하나의 meso-compound로 최종적인 결론이 내려졌다 (Fig. 3-2).

Petrosiacetylene B(95B-8-O)에 대하여 Mosher's method를 적용한 결과 95B-8-H의 경우와 동일한 결과를 얻었으며 ¹H COSY와 TOCSY 실험에 의하여 두 반응 생성물인 95B-8-OS와 95B-8-OR에 존재하는 모든 수소를 완전하게 결정하게 되었다. 특히 TOCSY 자료에서 비대칭물질인 이 물질의 H-21과 H-25를 함께 포함하는 하나의 긴 correlation이 관찰되어 두 terminal yneol-ene의 구분(C-1~C-5, C-26~C-30)이 가능하게 되었다. 이 결과 petrosiacetylene B의 입체배열은 petrosiacetylene A와 동일하게 3*R*, 28*S*로 결정되었다(Fig. 3-2).

Mosher method를 적용하여 petrosiacetylene C(95B-8-N)의 입체구조를 결정하려는 시도로부터 예기치 못했던 현상을 발견하였다. MTPA chlorides와 반응시켜 얻어진 esters의 ¹H NMR spectrum은 이들이 하나의 물질이 아니고 diastereomers의 혼합물임을 드러내었다. 이론적으로 MTPA esterification 반응에 의한 stereochemical conversion은 전혀 일어날 수 없으므로 이는 천연에서 petrosiacetylene C 자체가 하나의 물질이 아니라 두 종의 diastereomers(95B-8-Na, 95B-8-Nb)의 혼합물로 존재하는 것이 분명하였다. 이에 따라 각각의 반응물에 대하여 HPLC에 의한 분리를 시도한 결과 두 개의 물질이 분리되었다; (*S*)-MTPA ester로부터 95B-8-Na*S*와 95B-8-Nb*S*, (*R*)-MTPA ester로부터 95B-8-Na*R*과 95B-8-Nb*R*. 이들 네 종의 물질에 위치하는 모든 수소는 ¹H COSY와 TOCSY 실험으로 완전히 지정되었다. 이들의 상대적인 양은 ¹H NMR 상에서 동일한 위치에 해당하는 수소 signal(H-1과 H-30)의 면적으로 추정된 바 천연에서의 95B-8-Na와 95B-8-Nb의 상대적인 양은 3:2로 추정되었다. 또한 (*S*)-ester와 (*R*)-ester 간의 수소 chemical shift의 차로부터 95B-8-Na와 95B-8-Nb의 입체배열은 각각 3*S*, 28*S*와 3*S*, 28*R*로 결정되었다(Fig. 3-2).

동일한 실험에 의하여 petrosiacetylene D(95B-8-P)의 입체구조를 조사한 결과 이 물질 역시 petrosiacetylene C와 마찬가지로 두 종의 diastereomers(95B-8-Pa, 95B-8-Pb)의 혼합물임을 드러냈다. 또한 MTPA esters의 ¹H NMR 상에 있어서 H-1과 H-30의 상대적인 면적비로부터 -Pa와 -Pb가 4:1의 비율로 혼합되어 있음이 드러났다. MTPA esters간의 ¹H NMR 상의 비대칭 탄소와 인접한 수소의 chemical shift의 차이로부터 각각의 입체배열은 95B-8-Pa가 3*R*, 28*S*, 그리고 95B-8-Pb의 경우는 3*R*, 28*R*로 결정되었다(Fig. 3-2).

Petrosiacetylenes에 대한 입체화학적 연구결과는 여러 가지 면에서 흥미로운 사실을 포함하고 있다. 먼저 물질 95B-8-N과 -P는 천연에서 diastereomers의 혼합물로 존재하며 입체 비대칭물질인 MTPA와의 반응에 의해서만 그 실체가 드러난 점이다. 문헌 조사 결과 해면에서 유래한 polyacetylenes 중에서 각각 다른 지역에서 채집된 시료로부터 거울상 이성질체가 발견된 예는 있으나 동일한 시료로부터 diastereomers가 발견된 것은 petrosiacetylenes가 최초의 예이다(Ortega, et al, 1996). 두 번째 특징은 물

질 95B-8-H, -O, -Nb, -Pa간에 있어서 공통된 위치인 C-3과 C-28의 입체배열은 3R, 28S 혹은 3S, 28R로 서로 상이하다는 점이다. 이 사실은 현재까지 보고된 모든 C₃₀ polyacetylenes가 3R, 28R 혹은 3S, 28S 등으로 동일한 물질 내에서는 항상 동일한 입체배열을 가졌다는 사실과 상치되고 있다(Fusetani, *et al.*, 1987; Ochi, *et al.*, 1994; Kobayashi, *et al.*, 1996). 그리고 동일한 시료에서 분리된 천연물의 입체배열이 서로 대단히 다르다는 사실은 해면 유래의 polyacetylenes의 입체구조가 완전히 예측 불가능하며 구체적인 화학과 분광학적 방법에 의해서만이 지정될 수 있다는 사실을 의미하고 있다.

Petrosiacetylenes은 모두 구조적으로 C₃₀ polyacetylenes에 속한다. 문헌조사와 STM database에 대한 조사 결과 이 부류는 해면동물 뿐만 아니라 모든 해양천연물에서 대단히 드문 부류에 속함이 드러났다(Faulkner, 1997). 알려진 해양천연물 중 유사한 물질로는 일본근해에서 채집된 *Petrosia* sp.로부터 분리된 petrosynol 및 petrosynone 등과 *Adocia* sp.에서 분리된 adociacetylenes가 존재할 뿐으로서 본 연구에서 분리된 petrosiacetylenes의 천연물 화학적 가치가 매우 높음을 보여주었다(Fusetani, *et al.*, 1983; 1987a; Kobayashi, *et al.*, 1996).

3. Petroraspailynes와 petrynol의 분리 및 구조결정

15% 메탄올 수용액 층으로 분배된 조추출물에 대해서 고속 감압 C₁₈ reversed phase chromatography를 실시하였으며 용리용매로는 30%, 20%, 10% 메탄올 수용액과 100% 메탄올 그리고 100% EtOAc를 순차적으로 사용하였다. 얻어진 각 분획에 대한 ¹H NMR 스펙트럼 측정 결과 20와 10% 메탄올 수용액 분획에서 이차대사물질의 존재가 드러났다. 이들 분획에 대한 반복적인 HPLC로 모두 11개의 천연물을 분리하였으며 이들의 구조는 분광자료의 해석과 화학적 반응에 의하여 결정되었다(Fig. 3-3).

무색의 액체 형태로 분리된 물질 95B-8-E의 분자식은 HRFABMS와 ¹³C NMR 자료로부터 C₁₇H₂₈O₃로 결정되었다. 이 물질의 ¹³C NMR spectrum에서의 두드러진 특징은 olefinic carbon의 상용적인 위치인 δ 100~160 에 단지 세 개의 탄소에 해당하는 signal(δ 156.6, 143.0, 110.7)이 발견된다는 점이다(Fig. 3-25). 더욱이 IR spectrum에서 carbonyl 기가 존재하지 않음이 발견되었다. 따라서 이 물질의 double bond에는 alcohol(혹은 ether) 이나 acetylene 같은 의 탄소의 electron density에 영향을 크게 미치는 작용기가 접합되어 있음을 알 수 있었다. 그 밖에도 ¹³C NMR data에서는 여섯 개의 mid-field signals (δ 90.4, 89.5, 86.3, 75.4, 72.1, 63.9)가 발견되었다.

물질 95B-8-E의 구조는 ¹H NMR과 ¹H COSY, HSQC, HMBC등 2D NMR 실험에 의하여 규명되었다(Fig. 3-26~3-29). 먼저 δ 75.4(CH₂), 72.1(CH)와 63.9(CH₂)에 위치한 세 탄소에 결합되어 있는 다섯 개의 수소는 하나의 독립된 spin system을 이루고 있다는 것

이 발견되었다. 그러므로 이 천연물은 부분구조로서 하나의 glycerol을 갖고 있음이 밝혀졌다. 한편 δ 6.45, 5.82, 5.55 및 4.61에 위치한 수소 signals 간의 H-H coupling (^1H COSY 실험)과 이들 수소와 여러 개의 down- 혹은 mid-field 탄소간의 2-, 3-, 4-bond H-C correlations (HMBC 실험)은 하나의 yne-diene 기의 존재를 드러내었다. 이 해석을 지지하는 주요한 증거는 UV spectrum에서 275 ($\log \epsilon$ 3.84)와 291 (3.79) nm에 나타난 흡광 maxima이다. 전기한 glycerol 부분과 yne-diene과의 결합은 δ 3.99 및 3.91에 위치한 수소와 δ 156.6에 위치한 탄소간의 HMBC correlation에 의하여 yne-diene이 glycerol의 C-1 탄소와 ether 결합을 하고 있음이 밝혀졌다. 따라서 전기한 바와 같이 이중결합을 이루는 두 개의 탄소간의 chemical shifts의 차이가 매우 큰 (δ 156.6, CH; 86.3, CH) 이유는 이중결합이 enol의 형태를 이루고 있을 뿐만 아니라 인접한 원소에 대한 shielding 효과가 큰 삼중결합과도 결합되어 있기 때문이다. Glyceryl acetylenic enol-ether를 이루지 않는 나머지의 탄소는 일곱 개의 upfield methylenes와 하나의 methyl carbon에 불과하였으므로 이들은 모두 yne-diene에 긴 사슬의 형태로 연결되어 있음이 분명하였다. 이 물질에 존재하는 두 개의 이중결합의 geometry는 protons간의 vicinal coupling constants ($J_{1,2} = 6.4$ Hz, $J_{5,6} = 10.7$ Hz)로부터 1Z, 5Z configuration으로 지정되었다. 이로서 물질 95B-8-E의 구조는 선형의 acetylenic enol ether of glycerol로 결정되었다. STN database를 이용한 문헌조사 결과 이 물질은 지중해에 서식하는 해면 *Raspailia pumila*와 *Raspailia ramosa*의 대사물질로 보고된 raspailyne B1임이 밝혀졌다 (Guella, et al, 1986; 1987a; 1987b).

유사한 물질인 95B-8-D, -F 및 -U가 모두 무색의 액체 형태로 분리되었다. 고해상 질량분석에 의한 분자식 (95B-8-D, $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3$; 95B-8-F, $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$; 95B-8-U, $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$)을 제외하고는 IR과 UV data를 포함하여 이들의 분광자료는 raspailyne B1과 거의 동일하였다. 또한 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY, HSQC, HMBC 등 다양한 NMR 실험의 결과도 이들 모두가 raspailyne B1과 동일한 acetylenic enol ethers of glycerol계 물질임을 입증하였다 (Fig. 3-30~3-35). 따라서 이들의 분광자료 중에서 질량분석과 ^1H 및 ^{13}C NMR data 상의 미세한 차이는 linear chain의 길이나 형태의 차이에 기인한 것이다. 즉 yne-diene의 한 쪽 끝에 95B-8-D, -F, -U는 각각 *n*-heptyl, *iso*-nonyl, *isooctyl* 기가 결합된 것이다 (Fig. 3-3). 이러한 해석의 결과와 원래의 분광자료를 알려진 물질과 비교한 결과 물질 95B-8-D, -F, -U는 *R. pumila*와 *R. ramosa*의 대사물질로 보고된 바가 있는 raspailyne B2, isoraspailyne B 및 isoraspailyne B1으로 각각 밝혀졌다 (Guella, et al, 1987a; 1987b).

새로운 acetylenic enol ether glyceride인 물질 petroraspailyne A1 (95B-8-C)가 무색의 oil로 분리되었다. 이 물질은 전기한 raspailynes와 구조적으로 매우 유사하나 본 연구에 의하여 독자적인 방법으로 구조결정이 완료되었으므로 여기에서 상세히 설명한다. 이물질의 분자식은 고분별능 질량분석 (HRFABMS)과 ^{13}C NMR 데이터 분석에 의하여 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ 로 결정되었다 (Fig. 3-36). 먼저 이 물질의 ^1H NMR 스펙트럼에서 2개

의 이중결합에 해당하는 4개의 methine proton들의 signal이 δ 6.45, 5.81, 5.55, 4.61에 나타났으며 5개의 산화된 proton들에 해당하는 peak들이 δ 3.99, 3.91, 3.81, 3.61, 3.55에서 발견되었다(Fig. 3-37). 또 면적계산에 의해서 δ 2.30과 1.41에 각각 2개, 그리고 δ 1.31에 6개의 methylene proton들의 존재가 확인되었으며 δ 0.90에서 1개의 methyl signal이 나타났다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서는 모두 15개의 peak들이 나타났으며 DEPT실험에 의해서 methyl, methylene, methine, quaternary carbon들이 수가 각각 1, 7, 5, 2로 확인되었다(Fig. 3-38). ^1H COSY실험에 의하여 인접한 수소들간의 상관관계도 명확하게 결정되었으며 수소를 가지고 있는 모든 탄소들 즉 이중결합과 oxygenated methine carbon들을 포함한 모든 탄소 peak들도 HMQC 실험에 의하여 ^1H NMR 스펙트럼상의 모든 수소 peak들과 정확하게 연결되어 졌다(Fig. 3-39). 그러므로 δ 89.5와 90.3에 나타난 두 개의 quaternary carbon들은 quaternary hydroxy carbon과 chemical shift 값이 대단히 유사하였으나 질량분석 데이터와 관련지어 볼 때 이 peak들은 1개의 삼중결합 탄소들에서 기인한 신호들임을 알 수 있다.

절대배열을 포함한 이 물질의 완전한 구조결정은 chemical shift값의 논리적인 분석과 HMBC실험 그리고 chemical transformation과 synthesis에 의하여 이루어 졌다. HMQC와 ^1H COSY 실험에 의하여 결정된 두 개의 이중결합 탄소 peak들(δ 150.6, CH; δ 86.3, CH; 143.0, CH; 110.7, CH)과 수소 peak들(δ 6.45와 4.61)의 chemical shift 값들을 보면 일반적으로 나타나는 값과 상당히 다르다는 것을 알 수 있다. 이런 모든 현상은 이 두 개의 이중결합들 사이에 한 개의 삼중결합이 위치하게 되면 잘 설명되어 진다(Fig. 3-40). 또 HMBC실험에서 나타난 삼중결합 탄소들과 이 결합 전후에 존재하는 methine proton들과의 long-range correlations(H-1과 C-3, H-2와 C-4, H-5와 C-3, H-6과 C-4)도 이 해석을 지지하였다(Fig. 3-41). Enol ether bond의 존재도 HMBC 실험에서 나타난 3 bond H-C couplings(H-1과 C-1', H-1'와 C-1)에 의해서 확인되었다. 또한 인접한 수소들 간의 coupling constants에 의하여 두 개의 이중결합의 geometry는 모두 Z로 결정되었다($J = 10.7$ Hz; 6.3 Hz). 따라서 petroraspaillyne A1(95B-8-C)는 raspaillyne B1의 side-chain의 methylene이 하나 짧아진 새로운 acetylenic enol ethers of glycerol 계 신물질로 해석되었다(Fig. 3-3).

Petroraspaillyne A1에는 하나의 비대칭 탄소중심이 glycerol의 C-2'에 위치하고 있다. 이 탄소의 절대배열의 규명과 아울러 물질 전체구조의 확인은 천연물의 유기화학적 구조변환과 전합성에 의하여 이루어 졌다. 먼저 화합물 95B-8-C를 메탄올에 녹이고 10% palladium-charcoal을 촉매로 실온에서 15시간 동안 수소화 반응을 시도하였다. 용매를 제거한 후에 ^1H NMR 스펙트럼을 측정하였더니 이중결합 영역에 나타나던 peak들이 사라지고 δ 3.45에 새로운 oxygenated methylene 수소들이 나타나 alkyl ether glyceride인 chimyl alcohol의 ^1H NMR spectrum과 대단히 유사함을 보여주었다(Fig. 3-42). 이 물질에 대한 고분별능 질량분석 결과 분자식은 $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_3$ 로 결정되어 천연물이 2개의 이중결합과 1개의 삼중결합을 가지고 있었음을 알 수 있었다. 그러나 이 물질의

Table 3-1. Carbon NMR Assignments for Petroraspailynes A1-A3 and B1-B3.*

C No	A1	A2	A3	B1	B2	B3
1	156.5 d	156.5 d	156.5 d	155.8 d	155.8 d	155.8 d
2	86.3 d	86.3 d	86.3 d	86.6 d	86.6 d	86.7 d
3	89.5 s	89.5 s	89.5 s	76.0 s	76.0 s	76.0 s
4	90.3 d	90.4 s	90.4 s	93.6 s	93.6 s	93.6 s
5	110.7 d	110.7 d	110.7 d	20.3 t	20.3 t	20.3 t
6	143.0 d	142.9 d	143.0 d	30.1 t	30.2 t	30.0 t
7	31.1 t	31.1 t	31.1 t	30.0 t	30.3 t	30.6 t ^b
8	30.0 t ^c	30.3 t	30.3 t	30.4 t ^c	27.8 t	30.1 t ^b
9	29.8 t ^c	28.0 t	30.6 t	30.3 t ^c	37.7 t	28.5 t
10	32.9 t	40.0 t	28.0 t	33.0 t	35.7 d	40.2 t
11	23.7 t	29.2 d	37.8 t	23.7 t	30.6 t	29.2 d
12	14.5 q	23.1 q	35.7 d	14.5 q	11.8 q	23.0 q
13		23.1 q	30.6 t		19.6 q	23.0 q
14			11.8 q			
15			19.7 q			
1'	75.4 t	75.4 t	75.4 t	75.2 t	75.2 t	75.2 t
2'	72.1 d	72.1 d	72.1 d	72.1 d	72.1 d	72.1 d
3'	63.9 t	63.9 t	63.9 t	63.9 t	63.9 t	63.9 t

* Measured in CD₃OD solutions at 125 MHz. Assignments were aided by DEPT, HMQC, and gHMBC experiments. ^{b,c} Interchangeable signals.

비선광도(specific optical rotation: $[\alpha]_D$)를 측정하였더니 -0.1° (c 0.2, MeOH)의 매우 작은 값으로 나타나 입체구조 결정의 신뢰성이 문제가 되었다. 따라서 이 물질에 acetic anhydride를 가하여 diacetate 유도체를 합성하였으며 이 유도체의 비선광도($[\alpha]_D$)를 측정한 결과 -9.6° (c 0.15, MeOH)의 비교적 높은 값이 얻어 졌다(Fig. 3-43).

이 유도체를 인공적인 방법으로 획득하기 위하여 유기화학적 전합성이 시도되었다. (R)-(-)-2,2 dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol을 DMF에 녹이고 NaH를 첨가하여 1시간 동안 환류한 후에 bromodecane을 가하고 3시간 동안 추가적으로 환류하였다. 용매를 제거하고 잔류물을 산으로 가수분해한 후에 silica gel column chromatography로 분리하면 (S)-3 dodecyloxypropan-1,2-diol이 얻어 졌다. 이 물질을 acetylation 시켜 생성된 diacetate와 천연물 95B-8-C를 촉매환원 시킨 후에 다시 diacetate 유도체로 변형시켜 얻어진 물질을 비교하였더니 수소 NMR 스펙트럼에 나타난 peak들이 완전 동일하였다. 또

한 비선광도의 값도 각각 -11.6° 과 -9.6° 으로 잘 일치하여 서로 동일한 물질로 판단되었다. 그러므로 물질 **95B-8-C**의 절대배열은 2'S configuration으로 결정되었다. 이와 같이 천연물 petroraspaillyne A1의 정확한 구조는 (-)-(S)-3-(((1Z,5Z)-dodeca-1,5-dien-3-ynly)oxy]-propan-1,2-diol로 결정되었다(Fig. 3-3).

유사한 대사물질 petroraspaillyne A2(**95B-8-L**)이 분리되었다. HRMS에 의하여 분자식이 $C_{16}H_{26}O_3$ 로 결정된 이 물질의 NMR 스펙트럼은 **95B-8-C**와 대단히 유사하였다(Fig. 3-44). ^{13}C NMR spectrum에서의 유일한 차이점은 **95B-8-C**의 하나의 upfield methylene peak가 사라진 대신에 새로이 하나의 methine과 하나의 methyl carbon에 해당하는 signals(δ 29.2, CH: 23.1, CH_3)이 나타난 점이었다(Fig. 3-45). 이 물질의 1H NMR data에서도 **95B-8-C**의 terminal methyl에 해당하는 signal(δ 0.90, 3H, t, $J = 7.1$ Hz)의 위치와 형태가 변하였다(δ 0.88, 6H, d, $J = 6.4$ Hz)(Fig. 3-46). 1H COSY, HMBC 등 2D NMR 실험에서도 glycerol, yne-diene, enol ether 등 **95B-8-C**의 구조상의 모든 특징이 발견되었다. 그러므로 petroraspaillyne A2는 petroraspaillyne A1의 linear alkyl chain에 하나의 methyl기가 늘어난 유도체로 생각되었으며 이 새로운 작용기의 접합점은 두 개의 methyl기의 공통된 chemical shifts (δ 0.88, 6H)와 splitting pattern(d, $J = 6.4$ Hz)로 보아 alkyl chain의 끝부분으로 해석되었다. 따라서 petroraspaillyne A2(**95B-8-L**)은 (-)-(S)-3-(((1Z,5Z)-11-methyldodeca-1,5-dien-3-ynly)oxy]-propan-1,2-diol로 결정되었다(Fig. 3-3).

무색의 액체 형태로 분리된 petroraspaillyne A3(**95B-8-K**)의 분자식은 HRFABMS와 ^{13}C NMR 분석에 의하여 $C_{18}H_{30}O_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-47). 이 물질의 분광자료 역시 raspaillynes나 다른 petroraspaillynes와 대동하였으며 glycerol과 acetylenic enol ether기 등 구조적인 특징도 모두 존재하였다. Upfield에 위치한 탄소 수의 증가를 제외하고 **95B-8-K**의 ^{13}C NMR 상에서의 두드러진 차이점은 두 개의 methyl signals(δ 19.7, CH_3 11.8, CH_3)가 발견되었다는 점이었다(Fig. 3-48). 이들의 ^{13}C NMR chemical shifts와 1H NMR(δ 0.87, t, $J = 7.3$ Hz; 0.86 d, $J = 6.8$ Hz) spectra에서의 splitting pattern이 서로 상이하다는 사실은 linear chain에서 두 methyl기의 위치가 상이하다는 것을 의미하였다(Fig. 3-49). 끝가지에 위치한 methyl 기의 위치는 HSQC와 HMBC 실험으로 규명되었다. 즉 두 methyl protons(δ 0.87, 0.86)은 모두 동일한 carbons(δ 35.7, CH: 30.6 CH_2)과 H-C correlations을 나타내었으며 끝가지의 methyl proton(δ 0.86)은 다른 하나의 carbon(δ 37.8, CH_2)과도 correlation을 드러내었다. 따라서 끝가지의 methyl기는 C_{14} linear chain의 C-12에 접합되어 있음이 명확하였다. 이와 같이 천연물 petroraspaillyne A3(**95B-8-K**)의 구조는 (-)-(S)-3-(((1Z,5Z)-12-methyltetradeca-1,5-dien-3-ynly)oxy]-propan-1,2-diol로 결정되었다(Fig. 3-3).

무색의 액체로 분리된 petroraspaillyne B1(**95B-8-S**)의 분자식은 HRFABMS와 ^{13}C NMR 분석에 의하여 $C_{15}H_{26}O_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-50 and 3-51). 이 물질의 분광자료는 raspaillynes나 다른 petroraspaillynes에 비하여 상당한 차이점을 드러내었다. 먼저 ^{13}C

spectrum에서는 275와 290 nm 부근에 두 개의 maxima가 나타나는 대신에 단파장인 237 nm에 하나의 maximum 만이 존재하였다. 이는 yne-diene 작용기가 변화한 것을 의미하였다. ^{13}C NMR spectrum에서의 가장 큰 변화는 하나의 이중결합에 해당하던 탄소 signals($\delta \sim 143, 110$)이 upfield methylenes로 교환된 것이었다. 이에 상응하는 변화가 ^1H NMR data에서도 관찰되어 downfield region이 매우 간단하여 졌다(Fig. 3-52).

물질 95B-8-S에 일어난 구조적 변화는 ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 2D NMR 실험에 의하여 규명되었다(Fig. 3-52~3-55). Glycerol의 존재는 $\delta 4.0-3.5$ 에 위치한 수소 signals 간의 coupling으로 확인되었으며 이 부분과 double bond와의 enol ether 결합도 H-1/C-1' 및 H-1'/C-1 등의 3-bond H-C correlations로 명확히 확인되었다. 더욱이 HMBC 실험에서는 H-1, H-2 등 olefinic protons와 acetylenic carbons($\delta 93.6, \text{C}; 76.0, \text{C}$)간의 correlations도 함께 발견되었으므로 이들이 서로 직접 연결되어 있음이 드러났다. 따라서 나머지의 upfield carbons는 모두 하나의 긴 선형의 chain을 이루고 있으며 물질 95B-8-S는 95B-8-C의 C-5 이중결합이 포화된 유도체임이 분명하였다. 이 리하여 천연물 petroraspaillyne B1의 구조는 (-)-(S)-3-(((1Z)-dodeca-1-en-3-ynyl)oxy)-propan-1,2-diol로 결정되었다(Fig. 3-3).

유사한 물질인 petroraspaillyne B2(95B-8-T)의 분자식은 질량분석에 의하여 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-56). 이 물질의 분광자료는 95B-8-S와 대단히 유사하였으나 ^{13}C NMR과 ^1H NMR spectra에서 새로운 하나의 methyl기의 존재가 드러났다(Fig. 3-57 and 3-58). 분광자료를 세밀히 검토한 결과 새로운 methyl기에 의하여 야기된 NMR 상의 변화는 95B-8-K의 경우와 거의 동일하였다 [$^{13}\text{C} \delta 19.6 \text{ CH}_3, 11.8, \text{CH}_3; ^1\text{H} \delta 0.88(3\text{H}, \text{t}, J = 7.3 \text{ Hz}), 0.87(3\text{H}, \text{d}, J = 6.8 \text{ Hz})$]. 따라서 물질 95B-8-T 역시 곁가지의 C-10에 methyl 기가 접합된 branched chain을 갖고 있음이 분명하였다. 이 해석은 HMBC 실험에서 H-12와 C-10 및 C-11, H-13과 C-9, C-10, 및 C-11 간의 2-, 3-bond correlations가 다수 발견됨으로서 완벽히 입증되었다. 따라서 petroraspaillyne B2(95B-8-T)의 구조는 (-)-(S)-3-((1Z)-10-methyldodeca-1-en-3-ynyl)oxy]-propan-1,2-diol로 결정되었다(Fig. 3-3).

마지막으로 유사한 물질인 petroraspaillyne B3(95B-8-G)가 소량 분리되었다. 고해상 질량분석에 의하여 분자식이 $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 로 결정된 이 물질의 분광자료는 petroraspaillynes B1 및 B2와 매우 유사하여 glyceryl acetylenic enol ether의 모든 특징을 잘 나타내 주었다(Fig. 3-59). 이 물질 역시 하나의 methyl기로 이루어진 곁가지를 갖고 있었으며 ^{13}C NMR($\delta 23.0, \text{CH}_3 \times 2$)과 ^1H NMR($\delta 0.89, 6\text{H}, \text{d}, J = 6.8 \text{ Hz}$) 자료상의 특징으로 보아 곁가지가 linear chain의 끝에 위치함이 드러났다(Fig. 3-60~3-61). 따라서 petroraspaillyne B3 (95B-8-G)의 구조는 (-)-(S)-3-((1Z)-11-methyldodeca-1-en-3-ynyl)oxy]-propan-1,2-diol로 정의되었다(Fig. 3-3).

상기한 바와 같이 본 연구에서 거문도-백도 해역의 해면동물 *Petrosia* sp.로부터 10 종의 acetylenic enol ethers of glycerol계 물질을 분리하였다. 문헌조사에 의하면

이들은 100 여종에 달하는 해면의 acetylenes계 및 polyacetylenes계 천연물 중에서 대단히 드문 부류에 속한다는 사실이 밝혀졌다(Faulkner, 1997). 본 연구에서 분리된 물질과 *Raspailia* spp.로부터 보고된 수종의 유도체를 제외하고는 알려진 천연물 중 *P. hebes*로부터 분리된 3종의 천연물과 Okinawa 근해에 서식하는 *Petrosia* sp.에서 보고된 petrosynes 만이 yne-dienic enol ether 작용기를 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Perry, et al, 1990; Iguchi, et al, 1993). Petroraspailynes 처럼 acetylene기를 포함하고 있지는 않으나 해면 *Acanthella carteri*(= *A. aurantiaca*)의 천연물인 hanishenols A와 B도 glyceryl enol ether 기를 갖고 있다(Mancini, et al, 1997).

Raspailynes와 petroraspailynes가 함유된 것과 동일한 극성의 분획으로부터 상기한 glyceryl enol ether 외에도 하나의 전혀 다른 계열에 속하는 천연물이 분리되었으며 분광학적 방법에 의하여 그 구조가 결정되었다. 무색의 반고형 물질로 얻어진 petrynol (95B-8-A)의 분자식은 HRCIMS와 ^{13}C NMR 분석에 의하여 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-62). 이 물질의 ^{13}C NMR data는 전기한 glyceryl enol ethers와는 매우 상이하였다(Fig. 3-63). 먼저 downfield에 나타난 olefinic carbon의 signals(δ 134.3, CH; 128.5, CH)와 midfield에 나타난 세 개의 carbon signals(δ 83.3, C; 74.0, C; 62.8, CH)은 그들의 위치와 multiplicity가 petrosiacetylenes의 terminal yneol-ene 기와 매우 흡사하였다(Seo, et al, 1998). 이 작용기에 존재하는 이중결합의 geometry는 ^1H NMR에서 vicinal proton-proton coupling constant($J = 15.1$ Hz)의 측정에 의하여 *E*로 결정되었다(Fig. 3-64). 이 yneol-ene 작용기의 존재는 1H COSY, HMQC 등의 자료를 바탕으로 하여 HMBC 실험에서 δ 5.88, 5.59, 4.82 등의 수소와 인접한 탄소들 간에 나타난 여러 correlation으로 입증되었다(Fig. 3-65~3-67).

다른 물질과는 달리 ^{13}C NMR 상에서 δ 174.2(C)에 새로이 관찰된 탄소signal은 1740 cm^{-1} 에 나타난 강한 IR 흡광 band와 더불어 ester로 생각되었다. 이 탄소는 δ 3.65(3H, s)에 나타난 수소 signal과 강한 HMBC correlation을 나타내었으므로 물질 95B-8-A는 하나의 methyl ester 기를 갖고 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 하나의 물질을 이루는 양 쪽 termini가 명확히 결정되었으므로 upfield methylenes으로 이루어진 긴 꼬리가 두 개의 terminal functionalities를 서로 연결함을 알 수 있었다. 특히 δ 2.05(2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz)에 위치한 allylic protons와 δ 2.29(2H, t, $J = 7.6$ Hz)에 위치한 α -carbonyl protons를 포함하는 upfield protons 간의 TOCSY data는 이를 입증하는 결정적인 증거이다. 이와 같이 petrynol(95B-8-A)의 구조는 C_{12} linear carboxylic acid의 methyl ester로 결정되었다(Fig. 3-3).

Petrynol은 C-3 위치에 하나의 비대칭 탄소중심을 갖고 있다. Petrosiacetylenes의 경우와 마찬가지로 이 물질의 절대 입체배열은 Mosher method에 의하여 규명되었다. 즉 95B-8-A와 (-)-, (+)-MTPA chlorides를 반응시켜 만들어진 95B-8-AS와 95B-8-AR의 ^1H NMR spectrum 상에서 H-1, H-4~H-6 등 비대칭 탄소와 인접한 위치의 수소의 chemical shifts의 차이로부터 3*R* configuration으로 지정되었다. 이 물질과 알려진

C₄₆ linear polyacetylenes인 petrocortynes의 구조를 비교한 결과 흥미로운 사실이 발견되었다(Seo, et al, 1998; Shin, et al, 1998). 즉, 두 물질의 C-1~C-11에 해당하는 부분구조는 완전히 동일하였으며 C-3 비대칭 탄소의 입체배열도 동일하였다. 또한 지중해의 해면 *P. ficiformis*의 대사물질로 널리 알려진 petroformynes 와 비교하여도 동일한 C-1~C-12의 평면구조를 갖고 있었다(Guo, et al, 1994; 1995). 더욱이 petrynol에서 ester가 위치한 C-12 탄소는 petrocortynes에서 acetylene에 해당하였다. 생물체 내의 생합성적 반응에서 acetylene기의 변환이 매우 용이하다는 사실은 본 연구에서 분리된 petrosiacetylenes나 adociacetylenes의 경우로도 충분히 입증되고 있다(Kobayashi, et al, 1996). 따라서 petrynol은 petrocortynes의 생합성적 전구물질(precursor)이거나 분해물질(degradation product)로 생각되었다.

4. *Petrosia* sp.로부터 분리된 천연물의 생리활성

해면동물에서 유래한 polyacetylenes는 종류가 매우 다양하고 탄소 chain의 길이나 작용기의 변화가 무쌍하다(Faulkner, 1996; 1997; Umeyama, et al, 1997). 뿐만 아니라 이들은 매우 다양한 생리활성을 나타낸다. 널리 알려진 생리활성만 하여도 항미생물, 세포독성, 항종양, 항바이러스, 효소저해, brine-shrimp 독성 등 헤아릴 수 없을 정도이다(Fusetani, et al, 1987b; Cimino, et al, 1990; Issacs, et al, 1993; Guo, et al, 1994; Hallock, et al, 1995; Dai, et al, 1996a; Dai, et al, 1996b; Kobayashi, et al, 1996; Ortega et al, 1996; William & Faulkner, 1996; Fu, et al, 1997). 또한 일부의 polyacetylenes는 원색동물 유생의 변태를 촉진시키거나, 따개비 유생의 부착을 억제하고, 불가사리의 접합자(gamete)의 세포분열을 억제하는 등 생태학적으로 매우 중요한 역할을 하는 것이 발견되었다(Uno, et al, 1996; Tsukamoto, et al, 1997).

본 연구에서 분리된 천연물에 대하여 생리활성도를 조사한 결과 petrosiacetylenes A와 C는 brine-shrimp 유생에 대하여 강한 독성(LC₅₀ 0.22와 19.9 ppm)을 나타내었으나 다른 petrosiacetylenes는 독성이 전혀 없었다(LC₅₀ > 100 ppm). 놀라운 사실은 RNA를 이용한 reverse transcriptase(RT)에 대한 활성저해 실험과정에서 petrosiacetylenes A와 C는 10 μg/20 μL의 농도에서 template로 이용되었던 16S RNA(배양한 대장균으로부터 분리)를 완전히 분해한 것이다. 반면에 이들을 포함하는 모든 petrosiacetylenes는 super-coiled DNA(pUC 119)를 전혀 분해하지 않았다. 따라서 petrosiacetylenes A와 C의 강한 독성은 이들의 RNA 분해능과 깊은 관련이 있는 것으로 생각되었다. 구조적인 측면에서 petrosiacetylenes A와 C는 공통적으로 allylic ene-diyne 작용기를 갖고 있는데 비하여 다른 물질은 이러한 작용기가 결여되어 있다. 그러므로 고리화 반응이나 radical의 생성 등 ene-diyne기의 구조적 변환이 생리활성과

관련을 맺고 있는 것으로 유추되었다. 그밖에도 petrosiacetylenes B와 C는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 PLA_2 에 대하여 중 정도의 저해활성(각각 49%와 36%)을 나타내었으나 petrosiacetylenes A와 D는 훨씬 약하였다(20%와 23%). 또한 petrosiacetylenes B와 C는 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Na^+/K^+ -ATPase에 대한 약한 저해활성(각각 26%와 25%)를 나타내었다.

한편 petroraspailynes 등 본 연구에서 구조가 결정된 glycerol enol ethers에 대한 생리활성을 조사한 결과 raspailynes과 petroraspailynes A1, A2, A3 등 yne-diene기를 가진 물질들은 인체의 백혈병 세포인 K562에 대하여 중 정도의 독성을 갖고 있음이 밝혀 졌다: LC_{50} for 95B-8-E, 81 $\mu\text{g}/\text{mL}$; -D, 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$; -F, 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$; -U, 69 $\mu\text{g}/\text{mL}$; -C, 9.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; -L, 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. 반면에 하나의 double bond를 상실한 yne-ene 계열의 물질들(95B-8-S, -T, -G)은 활성을 나타내지 못하였다($\text{LC}_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{mL}$). 이로 미루어 acetylene의 양쪽에 위치한 double bonds가 이들의 생리활성에 관여함을 알 수 있었다. 또한 전기영동을 이용한 실험에서 이 들은 모두 10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 의 농도에서 topoisomerase I의 DNA 절단활성을 저해하는 것이 밝혀졌다. 그러나 yneol-ene 작용기를 가진 petryinol(95B-8-A)는 동일한 농도에서 세포독성과 효소저해 활성을 전혀 나타내지 못하였다.

5. 실험 방법

가. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

시료 95B-8은 95년 11월에 거문도 근해(서도, 대삼부도, 백도) 수심 20-25 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 채집 즉시 현장에서 드라이아이스로 냉동된 시료는 항공으로 운송되어 냉동고에 보관되었다. 냉동보관한 2 kg의 시료를 해빙하여 짧게 자른 후에 MeOH로 반복해서(2 L x 3) 추출하였으며 다시 dichloromethane으로 반복하여(2 L x 3) 추출하였다. 마지막으로 Waring blender로 간 후에 MeOH과 dichloromethane의 1:1 혼합용액(2 L x 1)으로 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물의 양은 353.38 g 이었다. 이 조추출물에 대하여 dichloromethane(1 L x 2)과 물(1 L x 1)의 분획을 이용하여 소금과 기타의 수용성 염을 제거하였다.

Dichloromethane층에서 얻어진 100.61 g은 다시 25% aqueous MeOH(0.5 L x 2)과 hexane(0.5 L x 1)으로 다시 분배하였다. 25% aqueous MeOH층의 용매를 제거하고 얻어진 조추출물 18.53 g을 acetone에 흡착시킨 후 C_{18} 고속 감압 크로마토그래피(5 cm x 5 cm, YMC ODS-A 60-125 gel 400 mesh)를 실시하였다. 용매로는 30% aq. MeOH, 20% aq. MeOH, 10% aq. MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc를 500 mL씩 순서대로 용출하였으며 얻어진 분획의 양은 각각 14.80 g, 0.88 g, 0.30 g, 0.56 g, 0.07 g이었다. 각 분획

(fraction, fx)들에 대해 ^1H NMR spectrum을 측정한 결과 2차 대사물질이 20% aq. MeOH와 10% aq. MeOH 분획에서 발견되었다.

나. Petrosiacetylenes의 분리

Aqueous MeOH층을 고속감압 C_{18} 크로마토그래피로 분리하여 얻어진 분획 3(10% aq. MeOH)을 15% aqueous MeOH에 녹이고 cotton으로 여과한 후에 C_{18} reversed-phase HPLC(Shiseido Capcell pak C_{18} column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 ml/min)로 분리를 시도하였다. Retention time 29, 36, 45, 60분에 나오는 peak들을 각각 모으고 다시 똑같은 조건하에서 용리용매만 30% aqueous MeCN으로 바꾼 후에 reversed-phase HPLC를 실시하였다. Retention time 26.5, 24, 28, 24.5분에 95B-8-H, -N, -O, -P가 각각 3.7, 2.1, 4.5, 4.2 mg 얻어 졌다.

Petrosiacetylene A (95B-8-H): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ 0° (c0.63, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 3310, 2930, 2860, 2100, 1650, 1460, 1285, 1090, 1015, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.91(2H, dddd, $J = 15.4, 7.1, 7.1, 1.0$ Hz, H-5, -26), 5.59(2H, ddt, $J = 15.4, 5.9, 1.5$ Hz, H-4, -27), 5.46 (2H, t, $J = 4.6$ Hz, H-15, -16), 4.81 (2H, ddd, $J = 5.9, 2.5, 1.0$ Hz, H-3, -28), 2.90 (4H, dt, $J = 4.9, 2.2$ Hz, H-14, -17), 2.54 (2H, d, $J = 2.5$ Hz, H-1, -30), 2.11 (4H, tt, $J = 7.1, 2.4$ Hz, H-11, -20), 2.05 (4H, td, $J = 7.3, 7.1$ Hz, H-6, -25), 1.44 (4H, m, H-10, -21), 1.39 (4H, m, H-7, -24), 1.36 (4H, m, H-9, -22), 1.29 (4H, m, H-8, -23); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 134.62 (CH x 2, C-5, -26), 128.70 (CH x 2, C-4, -27), 126.72 (CH x 2, C-15, -16), 83.58 (C x 2, C-2, -29), 80.65 (C x 2, C-12, -19), 77.93 (C x 2, C-13, -18), 62.99 (CH x 2, C-3, -28), 32.07 (CH_2 x 2, C-6, -25), 29.08 (CH_2 x 2, C-10, -21), 28.90 (CH_2 x 2, C-7, -24), 28.86 (CH_2 x 2, C-8, -23), 28.84 (CH_2 x 2, C-9, -22), 18.95 (CH_2 x 2, C-11, -20), 17.41 (CH_2 x 2, C-14, -17); HRFABMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 455.2949 (calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Na}$, 455.2926).

Petrosiacetylene B (95B-8-O): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ -0.3° (c0.49, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 3300, 2930, 2860, 2095, 1650, 1465, 1230, 1085, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.89 (2H, dddd, $J = 15.1, 6.9, 6.9, 1.0$ Hz, H-5, -26), 5.59 (2H, dd, $J = 15.1, 5.9$ Hz, H-4, -27), 5.44 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.36 (1H, m, H-12), 5.31 (1H, brdd, $J = 10.7, 6.4$ Hz, H-13), 4.82 (2H, brd, $J = 5.9$ Hz, H-3, -28), 2.91 (2H, brd, $J = 5.4$ Hz, H-17), 2.77 (2H, dd, $J = 6.8, 5.9$ Hz, H-14), 2.54 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1, -30), 2.12 (2H, tt, $J = 7.1, 2.1$ Hz, H-20), 2.06 (4H, td, $J = 7.3, 6.9$ Hz, H-6, -25), 2.02 (2H, td, $J = 6.9,$

6.5 Hz, H-11), 1.45 (2H, m, H-21), 1.38 (4H, m, H-7, -24), 1.36 (2H, m, H-22), 1.33 (2H, m, H-10), 1.31-1.28 (6H, m, H-8, -9, -23); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 134.46 (CH, C-5/-26), 134.40 (CH, C-5/-26), 130.56 (CH, C-12), 129.40 (CH, C-15), 128.40 (CH, C-4/-27), 128.36 (CH, C-4/-27), 127.13 (CH, C-13), 125.22 (CH, C-16), 83.32 (C, C-2/-29), 83.31 (C, C-2/-29), 80.14 (C, C-19), 78.21 (C, C-18), 73.98 (CH, C-1/-30), 73.97 (CH, C-1/-30), 62.80 (CH, C-3/-28), 62.79 (CH, C-3/-28), 31.93 (CH_2 , C-6/-25), 31.88 (CH_2 , C-6/-25), 29.53 (CH_2 , C-10), 29.10 (CH_2 , C-8/-9), 29.06 (CH_2 , C-8/-9), 28.93 (CH_2 , C-21), 28.80 (CH_2 , C-7/-24), 28.71 (CH_2 , C-7/-24), 28.68 (CH_2 , C-23), 28.66 (CH_2 , C-22), 27.22 (CH_2 , C-11), 25.55 (CH_2 , C-14), 18.79 (CH_2 , C-20), 17.25 (CH_2 , C-17); HRFABMS $[\text{M}+\text{K}]^+ m/z$ 473.2823 (calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{K}$, 473.2777).

Petrosiacetylene C (95B-8-N): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ 0.2° (c0.15, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 3295, 2930, 2855, 2100, 1660, 1465, 1240, 1060, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.89 (1H, br ddd, $J = 15.6, 6.6, 6.6$ Hz, H-26), 5.59 (1H, ddd, $J = 15.6, 6.6, 1.5$ Hz, H-27), 5.47 (2H, t, $J = 4.6$ Hz, H-15, -16), 4.82 (1H, br d, $J = 6.2$ Hz, H-28), 4.35 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 2.0$ Hz, H-3), 2.91 (4H, dt, $J = 4.4, 2.2$ Hz, H-14, -17), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-30), 2.44 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.12 (2H, tt, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-11, -20), 2.07 (2H, dt, $J = 6.6, 6.6$ Hz, H-25), 1.69 (2H, m, H-4), 1.44 (4H, m, H-10, -21), 1.41 (2H, m, H-24), 1.39 (2H, m, H-22), 1.36 (2H, m, H-9), 1.32-1.27 (8H, m, H-6, -7, -8, -23); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 134.41 (CH, C-26), 128.40 (CH, C-27), 126.47 (CH, C-15/-16), 126.43 (CH, C-15/-16), 84.98 (C, C-2), 83.58 (C, C-29), 80.48 (C, C-12/-19), 80.39 (C, C-12/-19), 77.68 (C, C-13/-18), 77.61 (C, C-13/-18), 62.79 (CH, C-28), 62.33 (CH, C-3), 37.65 (CH_2 , C-4), 31.88 (CH_2 , C-25), 29.39 (CH_2), 29.19 (CH_2), 29.05 (CH_2), 28.98 (CH_2 , C-10/-21), 28.89 (CH_2 , C-10/-21), 28.84 (CH_2 , C-9), 28.70 (CH_2 , C-24), 28.67 (CH_2 , C-23), 28.65 (CH_2 , C-22), 25.01 (CH_2 , C-5), 18.79 (CH_2 , C-11/-20), 18.76 (CH_2 , C-11/-20), 17.22 ($\text{CH}_2 \times 2$, C-14, -17); HRDCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ m/z$ 452.3529 (calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{NO}_2$, 452.3529).

Petrosiacetylene D (95B-8-P): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ +5.2° (c0.27, MeOH). IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 3295, 2930, 2850, 2095, 1650, 1460, 1290, 1090, 1010, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.89 (2H, ddd, $J = 15.4, 6.1, 6.1$ Hz, H-5, -26), 5.59 (2H, dd, $J = 15.4, 6.7$ Hz, H-4, -27), 5.42 (1H, dt, $J = 10.7, 6.4$ Hz, H-15), 5.39 (1H, dt, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-16), 4.81 (2H, br d, $J = 5.9$ Hz, H-3, -28), 2.87 (2H, dt, $J = 5.9, 2.4$ Hz, H-17), 2.54 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1, -30), 2.12 (2H, tt, $J = 7.1, 2.4$ Hz, H-20), 2.06 (4H, td, $J = 7.1, 6.7$ Hz, H-6, -25), 2.03 (2H, dt, $J = 6.4, 7.3$ Hz, H-14), 1.45 (2H, m, H-21), 1.38 (2H, m, H-24),

1.36 (4H, m, H-7, -22), 1.32 (2H, m, H-13), 1.29 (2H, m, H-23), 1.28-1.25 (10H, m, H-8~-12): ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 134.56 (CH, C-5/-26), 134.41 (CH, C-5/-26), 131.30 (CH, C-15), 128.39 (CH, C-4/-27), 128.30 (CH, C-4/-27), 124.92 (CH, C-16), 83.33 (C, C-2/-29), 83.31 (C, C-2/-29), 79.94 (C, C-19), 78.52 (C, C-18), 73.98 (CH, C-1/-30), 73.96 (CH, C-1/-30), 62.81 (CH, C-3/-28), 62.79 (CH, C-3/-28), 31.95 (CH_2 , C-6/-25), 31.88 (CH_2 , C-6/-25), 29.54 (CH_2), 29.50 (CH_2), 29.46 (CH_2), 29.41 (CH_2 , C-13), 29.27 (CH_2), 29.19 (CH_2), 28.95 (CH_2 , C-21), 28.71 (CH_2 , C-24), 28.69 (CH_2 , C-23), 28.65 (CH_2 , C-22), 27.13 (CH_2 , C-14), 18.79 (CH_2 , C-20), 17.21 (CH_2 , C-17): HRFABMS $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 475.2927 (calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2\text{K}$, 475.2978).

다. Petrosiacetylenes의 MTPA 에스터화 반응 (modified Mosher method) 및 butyric ester의 합성

MTPA 에스터화 반응은 Kakisawa group에서 1991년에 보고한 modified Mosher's method를 따랐다(Ohtani, *et al.*, 1991). 일반적인 반응의 방법은 0.5 ml의 dry pyridine에 3-5 mg의 시료를 녹인 후에 20 μL 의 (-)- 혹은 (+)-MTPA chlorides (methoxy α, α, α -trifluoromethylphenylacetic acid chlorides)를 가하였다. 이 용액을 상온에서 N_2 대기 하에서 1-3 시간 방치하면서 silica TLC로 반응의 진행을 확인하였다. 에스터화 반응이 이루어진 것을 출발물질의 소멸로서 확인한 후에 0.5 mL의 H_2O , 0.3 mL의 CH_2Cl_2 , 1 mL의 MeOH을 순서대로 가하고 10 분간 방치하였다. 여분의 용매와 기타의 액체성분을 감압 하에서 제거한 후에 남은 갈색의 반고형 성분을 2 ml의 5% EtOAc-*n*-hexane 용액에 녹인 후 silica Sep-pak column을 통과시켰다. 용리액은 다시 역상 HPLC(YMC ODS column, 1 cm x 25 cm, 2 mL/min., 5% aq. MeCN)로 분리하여 순수한 petrosiacetylenes의 MTPA ester를 획득하였다.

(S) MTPA ester of Petrosiacetylene A. From 3.1 mg of **95B-8-H** was obtained 2.0 mg of **95B-8-HS**: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 7.1$ Hz, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-26), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.48 (2H, br t, $J = 4.9$ Hz, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-14, -17), 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.12 (4H, br t, $J = 7.1$ Hz, H-11, -20), 2.08 (2H, dt, $J = 7.1, 7.1$ Hz, H-6), 2.05 (2H, dt, $J = 7.1, 7.1$ Hz, H-25), 1.45 (4H, m, H-10, -21), 1.38 (2H, m, H-7), 1.36 (4H, m, H-9, -22), 1.35 (2H, m, H-24), 1.28

(2H, m, H-8), 1.26 (2H, m, H-23).

(R)-MTPA ester of Petrosiacetylene A. From 3.0 mg of **95B-8-H** was obtained 2.1 mg of **95B-8-HR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 7.1$ Hz, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 5.48 (2H, br t, $J = 4.9$ Hz, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-14, -17), 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.12 (4H, br t, $J = 7.1$ Hz, H-11, -20), 2.08 (2H, dt, $J = 7.1, 7.1$ Hz, H-25), 2.05 (2H, dt, $J = 7.1, 7.1$ Hz, H-6), 1.45 (4H, m, H-10, -21), 1.38 (2H, m, H-24), 1.36 (4H, m, H-9, -22), 1.35 (2H, m, H-7), 1.28 (2H, m, H-23), 1.26 (2H, m, H-8).

(S)-MTPA ester of Petrosiacetylene B. From 2.6 mg of **95B-8-O** was obtained 1.7 mg of **95B-8-OS**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.4$ Hz, ArH), 7.41-7.37 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.00 (1H, br dt, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-26), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.43 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.36 (1H, m, H-12), 5.34 (1H, m, H-13), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (2H, dt, $J = 5.0, 2.4$ Hz, H-17), 2.78 (2H, br dd, $J = 6.8, 5.9$ Hz, H-14), 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.13 (2H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.09 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-6), 2.04 (4H, m, H-11, -25), 1.46 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-21).

(R)-MTPA ester of Petrosiacetylene B. From 2.9 mg of **95B-8-O** was obtained 2.1 mg of **95B-8-OR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.41-7.37 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.00 (1H, m, H-28), 5.61 (1H, br dd, $J = 15.6, 6.8$ Hz, H-27), 5.50 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-4), 5.43 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.37 (1H, m, H-12), 5.34 (1H, m, H-13), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (2H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-17), 2.79 (2H, br dd, $J = 6.4, 6.4$ Hz, H-14), 2.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-30), 2.13 (2H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.09 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-25), 2.04 (4H, m, H-6 -11), 1.46 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-21).

(S)-MTPA ester of Petrosiacetylene C. From 2.6 mg of **95B-8-N** were obtained 1.7 mg of **95B-8-NaS** and 1.1 mg of **95B-8-NbS**: **95B-8-NaS**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.03 (1H, br

d. $J = 6.8$ Hz, H-28), 6.01 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-26), 5.54 (1H, td, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-3), 5.50 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-27), 5.48 (2H, m, H-15, -16), 3.60 (3H, s, OMe), 3.56 (3H, s, OMe), 2.93 (4H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-14, -17), 2.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-30), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.13 (4H, m, H-11, -20), 2.05 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-25), 1.79 (2H, m, H-4), 1.45 (4H, p, $J = 7.3$ Hz, H-10, -21): **95B-8-NbS**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-26), 6.01 (1H, br d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.54 (1H, dt, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-3), 5.48 (2H, m, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (4H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-14, -17), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.13 (4H, m, H-11, -20), 2.09 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-25), 1.79 (2H, m, H-4), 1.45 (4H, p, $J = 7.3$ Hz, H-10, -21).

(R)-MTPA ester of Petrosiacetylene C. From 3.9 mg of **95B-8-N** were obtained 1.7 mg of **95B-8-NaR** and 1.0 mg of **95B-8-NbR**: **95B-8-NaR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, br dt, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-26), 6.01 (1H, br d, $J = 6.3$ Hz, H-28), 5.61 (1H, br dd, $J = 15.1, 7.2$ Hz, H-27), 5.52 (1H, br t, $J = 6.6$ Hz, H-3), 5.48 (2H, t, $J = 4.6$ Hz, H-15, -16), 3.55 (6H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, $J = 4.6, 2.1$ Hz, H-14, -17), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.49 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.13 (4H, tt, $J = 7.3, 2.0$ Hz, H-11, -20), 2.09 (2H, dt, $J = 6.8, 7.3$ Hz, H-25), 1.86 (2H, m, H-4), 1.46 (2H, m, H-21): **95B-8-NbR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.03 (1H, br d, $J = 6.3$ Hz, H-28), 6.00 (1H, br dt, $J = 15.1, 7.1$ Hz, H-26), 5.51 (1H, br t, $J = 6.8$ Hz, H-3), 5.50 (1H, m, H-27), 5.48 (2H, t, $J = 4.6$ Hz, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, $J = 4.6, 2.1$ Hz, H-14, -17), 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.13 (4H, tt, $J = 7.3, 2.1$ Hz, H-11, -20), 2.05 (2H, dt, $J = 6.8, 7.3$ Hz, H-25), 1.86 (2H, m, H-4), 1.45 (2H, m, H-21).

(S)-MTPA ester of Petrosiacetylene D. From 2.5 mg of **95B-8-P** were obtained 1.4 mg of **95B-8-PaS** and 0.4 mg of **95B-8-PbS**: **95B-8-PaS**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-26), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-17), 2.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-30), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.13 (2H,

tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.08 (2H, dt, $J = 6.8, 7.3$ Hz, H-6), 2.06 (2H, m, H-25), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-20): **95B-8-PbS**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (2H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5, -26), 6.01 (2H, m, H-3, -28), 5.61 (2H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4, -27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.55 (6H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, $J = 4.9, 2.4$ Hz, H-17), 2.59 (2H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1, -30), 2.13 (2H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.08 (4H, m, H-6, -25), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-21).

(R)-MTPA ester of Petrosiacetylene D. From 3.2 mg of **95B-8-P** were obtained 1.6 mg of **95B-8-PaR** and 0.5 mg of **95B-8-PbR**: **95B-8-PaR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 500 MHz) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-5), 5.61 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-27), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, $J = 5.4, 2.4$ Hz, H-17), 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1), 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-30), 2.13 (2H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.09 (2H, dt, $J = 7.3, 7.3$ Hz, H-25), 2.04 (2H, m, H-6), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-21): **95B-8-PbR**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.03 (2H, br d, $J = 6.3$ Hz, H-3, -28), 6.01 (2H, m, H-5, -26), 5.50 (2H, br dd, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-4, -27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (6H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, $J = 5.4, 2.4$ Hz, H-17), 2.63 (2H, d, $J = 2.4$ Hz, H-1, -30), 2.13 (2H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-20), 2.06-2.01 (6H, m, H-6, -14, -20), 1.45 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, H-21).

(S)-2-Methylbutyl ester of petrosiacetylene A. 물질 **95B-8-H** 0.9 mg을 3 mL의 dry pyridine에 녹인 후 1 mL의 (S)-2-methylbutyric acid, 28 mg의 DCC, 1 mg의 DMAP를 순서대로 가하였다. 혼합물을 질소대기 하에서 상온에서 2 시간 동안 교반한 후 질소를 이용하여 용매를 제거하였다. 잔류물은 silica column chromatography(0.5 cm x 10 cm)에 흡착시킨 후 10 mL의 30% EtOAc/hexane 용액 5 mL로 용출하였다. 최종적인 분리정제는 semi-preparative reversed-phase HPLC(YMC ODS column, 1 cm x 25 cm, 5% aq. MeCN)로 0.9 mg의 물질 **95B-8-HX**를 무색의 oil 형태로 획득하였다: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.00 (2H, br dt, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-5, -26), 5.86 (1H, br d, $J = 6.4$ Hz, H-3, -28), 5.84 (1H, br d, $J = 6.4$ Hz, H-3/-28), 5.537 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.4$ Hz, H-4/-27), 5.535 (1H, br dd, $J = 15.1, 6.4$ Hz, H-4/-27), 5.49 (2H, t, $J = 4.4$ Hz, H-15, -16), 2.93 (4H, dt, $J = 4.4, 2.4$ Hz, H-14, -17), 2.543 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1/-30), 2.538 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1/-30), 2.40 (2H, hex., $J = 6.8$ Hz, H-2', -2''), 2.13 (4H, tt, $J = 7.3, 2.4$ Hz, H-11, -20), 2.07 (4H, dt, $J = 6.8, 7.3$

Hz, H-6, -25), 1.71 (1H, hex., $J = 7.3$ Hz, H-3'/-3"), 1.68 (1H, hex., $J = 7.3$ Hz, H-3'/-3") 1.50 (2H, m, H-3', -3"), 1.47 (4H, p, $J = 7.3$ Hz, H-10, -21), 1.40 (4H, p, $J = 7.3$ Hz, H-7, -24), 1.35 (4H, m, H-9, -22), 1.30 (4H, m, H-8, -23), 1.16 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-5'/-5"), 1.15 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-5'/-5"), 0.92 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4'/-4"), 0.91 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-4'/-4"): HRFABMS $[M+Na]^+$ m/z 623.4092 (calculated for $C_{40}H_{56}O_4Na$, 623.4076).

라. Acetylenic enol ethers of glycerol들과 petrynol의 분리

전기한 (5. 가.) *Petrosia* sp.의 조 추출물로부터 분배한 15% aqueous MeOH층을 감압 건조한 후에 고속 감압 C_{18} reversed-phase 크로마토그래피로 분리하여 얻어진 분획 2(20% aq. MeOH, 0.88 g)을 15% aq. MeOH에 녹이고 Sep-pak filter로 여과한 후에 용출된 물질에 대하여 C_{18} reversed-phase HPLC(YMC ODS-A C_{18} column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 mL/min, 15% aq. MeOH)로 분리를 시도하였다. 머무름 시간 retention time) 9, 13, 14(두 종의 물질), 15, 17(두 종의 물질), 19분에 나오는 peak들을 각각 모으고 다시 똑 같은 조건하에서 용리 용매만 30% aq. MeCN으로 바꾼 후에 reversed-phase HPLC를 실시하였다. 머무름 시간 14, 16.5, 17.5, 18.5, 20, 25, 30, 31, 36분에 95B-8-A, -C, -S, -L, -D, -G, -T, 및 -E가 각각 2.0, 13.1, 3.2, 10.4, 6.4, 10.4, 1.2, 3.3 mg 얻어 졌다.

또한 위에서 얻어졌던 고속 감압 reversed phase 크로마토그래피의 분획 10% 메탄올 수용액층(fx 3, 0.30 g)을 15% 메탄올 수용액에 녹이고 Sep-pak column으로 여과한 후에 reversed-phase HPLC(YMC ODS-A, 2 x 25 cm, RI detector, 2 mL/min, 15% aq. MeOH)로 분리를 시도하여 retention time 18, 20, 23, 24분에 나오는 peak를 모으고 다시 reversed-phase HPLC(YMC ODS-A column, 2 x 25 cm, RI detector, 2 mL/min, 30% aq. MeCN)로 분리하여 22, 24, 30, 31분에서 2차 대사물질 95B-8-U, -D, -K, -F를 차례대로 각각 2.8, 9.5, 1.7, 4.0 mg 얻어 졌다.

Raspailyne B1 (95B-8-E): colorless oil, $[\alpha]_D^{25} -3.6^\circ$ (c0.32, MeOH): UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 275 (3.84), 291 (3.79) nm: IR (KBr) ν_{max} 3350 (broad), 2925, 2860, 2180, 1625, 1460, 1150, 1090, 1050 cm^{-1} : 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, $J = 10.7, 7.3$ Hz, H-6), 5.55 (1H, br d, $J = 10.7$ Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, $J = 6.4, 2.5$ Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, $J = 7.3, 1.5, 7.3$ Hz, H-7), 1.40 (2H, quin., $J = 7.3$ Hz, H-8), 1.30 (10H, m, H-9~14), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-14): ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)

δ 156.6 (CH, C-1), 143.0 (CH, C-6), 110.7 (CH, C-5), 90.4 (C, C-4), 89.5 (C, C-3), 86.3 (CH, C-2), 75.4 (CH₂, C-1'), 72.1 (CH, C-2'), 63.9 (CH₂, C-3'), 33.1 (CH₂, C-12), 31.1 (CH₂, C-7), 30.6 (CH₂, C-9/-10/-11), 30.4 (CH₂, C-9/-10/-11), 30.3 (CH₂, C-9/-10/-11), 30.0 (CH₂, C-8), 23.7 (CH₂, C-13), 14.5 (CH₃, C-14) HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 303.1931 (calculated for C₁₇H₂₈O₃Na, 303.1936).

Raspailyne B2 (95B-8-D): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ -4.1° (c0.40, MeOH): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 276 (3.78), 290 (3.46) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3350 (broad), 2925, 2855, 2180, 1630, 1460, 1270, 1160, 1090, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, *J* = 10.7, 7.3 Hz, H-6), 5.55 (1H, br d, *J* = 10.7 Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, *J* = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, *J* = 10.7, 4.6 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, *J* = 7.3, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.40 (2H, m, H-8), 1.31 (8H, m, H-9, -10, -11, -12), 0.89 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-13); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 156.6 (CH, C-1), 143.0 (CH, C-6), 110.7 (CH, C-5), 90.4 (C, C-4), 89.5 (C, C-3), 86.3 (CH, C-2), 75.4 (CH₂, C-1'), 72.1 (CH, C-2'), 63.9 (CH₂, C-3'), 33.0 (CH₂, C-11), 31.1 (CH₂, C-7), 30.3 (CH₂, C-9/-10), 30.2 (CH₂, C-9/-10), 30.0 (CH₂, C-8), 23.7 (CH₂, C-12), 14.5 (CH₃, C-13); HRCIMS [M+NH₄]⁺ *m/z* 284.2231 (calculated for C₁₆H₃₀NO₃, 284.2226).

Isoraspailyne B (95B-8-F): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ -2.3° (c0.14, MeOH): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 275 (3.71), 290 (3.48) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3400 (broad), 2930, 2860, 2180, 1630, 1600, 1465, 1365, 1160, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, *J* = 10.7, 7.6 Hz, H-6), 5.55 (1H, ddt, *J* = 10.7, 2.4, 1.5 Hz, H-5), 4.62 (1H, dd, *J* = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, *J* = 11.0, 4.6 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.1 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, *J* = 11.2, 4.9 Hz, H-3'), 3.56 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.9 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, *J* = 7.6, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.52 (1H, sept., *J* = 6.6 Hz, H-13), 1.41 (2H, m, H-8), 1.30 (6H, m, H-9, -10, -11), 1.18 (2H, m, H-12), 0.87 (6H, d, *J* = 6.8 Hz, H-14, -15); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 156.5 (CH, C-1), 143.0 (CH, C-6), 110.7 (CH, C-5), 90.3 (C, C-4), 89.5 (C, C-3), 86.3 (CH, C-2), 75.4 (CH₂, C-1'), 72.1 (CH, C-2'), 63.9 (CH₂, C-3'), 40.3 (CH₂, C-12), 31.1 (CH₂, C-7), 30.9 (CH₂, C-10), 30.3 (CH₂, C-9), 30.0 (CH₂, C-8), 29.2 (CH, C-13), 28.5 (CH₂, C-11), 23.1 (CH₃ x 2, C-14, -15); HRCIMS [M+NH₄]⁺ *m/z* 312.2537 (calculated for C₁₈H₃₄NO₃, 312.2539).

Isoraspailyne B1 (95B-8-U): colorless oil, $[\alpha]_D^{25}$ +1.0° (c0.32, MeOH): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 276 (3.82), 291 (3.63) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3350 (broad),

2930, 2855, 2180, 1630, 1605, 1460, 1365, 1280, 1160, 1090 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, $J = 10.3, 7.8$ Hz, H-6), 5.55 (1H, br d, $J = 10.3$ Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, $J = 6.3, 2.4$ Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, $J = 10.7, 4.6$ Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, $J = 11.2, 4.9$ Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, $J = 11.2, 5.9$ Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, $J = 7.8, 1.5, 7.3$ Hz, H-7), 1.52 (1H, m, H-12), 1.41 (2H, m, H-8), 1.31 (4H, m, H-9, -10), 1.17 (2H, m, H-11), 0.88 (6H, d, $J = 6.3$ Hz, H-13, -14); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 156.7 (CH, C-1), 143.0 (CH, C-6), 110.7 (CH, C-5'), 90.4 (C, C-4), 89.5 (C, C-3), 86.3 (CH, C-2), 75.4 (CH_2 , C-1'), 72.1 (CH, C-2'), 63.9 (CH_2 , C-3'), 40.2 (CH_2 , C-11), 31.1 (CH_2 , C-7), 30.5 (CH_2 , C-9), 30.0 (CH_2 , C-8), 29.2 (CH, C-12), 28.3 (CH_2 , C-10), 23.1 ($\text{CH}_3 \times 2$, C-13, -14); HRFABMS [$\text{M}+\text{Na}$] m/z 303.1939 (calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Na}$, 303.1936).

Petroraspailyne A1 (95B-8-C): colorless oil, $[\alpha]_D^{25} -3.2^\circ$ (c0.32, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 276 (3.74), 291 (3.58) nm; IR (KBr) ν_{max} 3450 (broad), 2925, 2860, 2160 (weak), 1630, 1560, 1260, 1100, 1050 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, $J = 10.8, 7.3$ Hz, H-6), 5.55 (1H, br d, $J = 10.8$ Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, $J = 6.3, 2.4$ Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, $J = 10.7, 4.6$ Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, $J = 7.3, 1.5, 7.3$ Hz, H-7), 1.40 (2H, m, H-8), 1.31 (6H, m, H-9, -10, -11), 0.90 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-12); ^{13}C NMR, see Table; HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-1, C-4, C-5, C-6; H-5/C-3, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7, C-8; H-7/C-5, C-6, C-8 (-9); H-12/C-10, C-11; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFABMS [$\text{M}+\text{Na}$] m/z 275.1627 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$, 275.1623).

Petroraspailyne A2 (95B-8-L): colorless oil, $[\alpha]_D^{25} -3.2^\circ$ (c0.40, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 275 (3.82), 291 (3.64) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 2925, 2860, 2180, 1630, 1460, 1370, 1160, 1050 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, $J = 10.7, 7.6$ Hz, H-6), 5.56 (1H, br d, $J = 10.7$ Hz, H-5), 4.62 (1H, dd, $J = 6.8, 2.5$ Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J = 10.7, 6.4$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, $J = 11.2, 5.9$ Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, $J = 7.6, 1.5, 7.3$ Hz, H-7), 1.52 (1H, m, H-11), 1.37 (2H, m, H-8), 1.33 (2H, m, H-9), 1.20 (2H, m, H-10), 0.88 (6H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12, -13); ^{13}C NMR data, see Table; HMBC correlations H-1/C-2, C-4, C-1'; H-2/C-4; H-7/C-5, C-6, C-8; H-12(13)/C-10, C-11, C-13(12); H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-3';

H-3'/C-1', C-2': HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 266.1879 (calculated for C₁₆H₂₆O₃, 266.1882).

Petroraspailyne A3 (95B-8-K): colorless oil, [α]_D²⁵ +2.6° (c0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 276 (3.92), 290 (3.74) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 2960, 2925, 2855, 2180, 1630, 1460, 1375, 1270, 1090, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.45 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, *J* = 10.8, 7.3 Hz, H-6), 5.56 (1H, br d, *J* = 10.8 Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, *J* = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, *J* = 11.2, 4.9 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, *J* = 7.3, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.41 (2H, m, H-8), 1.36 (2H, m, H-13), 1.33 (1H, m, H-11), 1.31 (5H, m, H-9, -10, -12), 1.12 (1H, m, H-11), 0.87 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, H-14), 0.86 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-15); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) data, see Table : HMBC correlations H-1/C-2, C-3; H-2/C-1, C-4; H-5/C-3, C-6, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7; H-7/C-5, C-6, C-8; H-14/C-12, C-13; H-15/C-11, C-12, C-13; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2': HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 317.2096 (calculated for C₁₈H₃₀O₃Na, 317.2093).

Petroraspailyne B1 (95B-8-S): colorless oil, [α]_D²⁵ +0.5° (c0.21, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 237 (3.57) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (broad), 2930, 2860, 1635, 1460, 1375, 1280, 1160, 1090 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.36 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, *J* = 6.8, 2.2 Hz, H-2), 3.96 (1H, dd, *J* = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.80 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, *J* = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.55 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.29 (2H, dt, *J* = 2.2, 7.0 Hz, H-5), 1.51 (2H, quin., *J* = 7.0 Hz, H-6), 1.42 (2H, m, H-7), 1.31 (8H, m, H-8, -9, -10, -11), 0.90 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-12); ¹³C NMR data, see Table: HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-1, C-4; H-5/C-1, C-2, C-3, C-4, C-6(-7); H-6/C-4, C-5; H-12/C-10, C-11; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2': HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 277.1794 (calculated for C₁₅H₂₆O₃Na, 277.1780).

Petroraspailyne B2 (95B-8-T): colorless oil, [α]_D²⁵ +5.5° (c0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 238 (3.51) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400, 2930, 2860, 1635, 1460, 1400, 1160, 1090 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.35 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, *J* = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.96 (1H, dd, *J* = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, *J* = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, *J* = 11.2, 5.9 Hz, H-3'), 2.29 (2H, dt, *J* = 2.4, 6.8 Hz, H-5), 1.51 (1H, quin., *J* = 6.8 Hz, H-6), 1.40 (2H, m, H-7), 1.32 (6H, m, H-8, -9, -10, -11), 1.14 (1H, m, H-9), 0.88 (3H, t, *J* = 7.3 Hz, H-12), 0.87 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-13); ¹³C NMR data, see Table : HMBC correlations H-1/C-2, C-3; H-5/C-1,

C-2, C-3, C-4: H-6/C-4, C-5: H-12/C-10, C-11: H-13/C-9, C-10, C-11: H-1'/C-1, C-2', C-3': H-3'/C-1', C-2': HRFABMS $[M+Na]^+$ m/z 291.1942 (calculated for $C_{16}H_{28}O_3Na$, 291.1936).

Petroraspaillyne B3 (95B-8-G): colorless oil, $[\alpha]_D^{25} -3.7^\circ$ (c0.30, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 238 (3.57) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400, 2930, 2860, 2200 (weak), 1635, 1460, 1325, 1160, 1090, 1050 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.36 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, $J = 6.4, 2.4$ Hz, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-1'), 3.88 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.62 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-3'), 3.56 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 2.30 (2H, dt, $J = 2.0, 6.8$ Hz, H-5), 1.53 (1H, m, H-11), 1.51 (2H, m, H-6), 1.32 (6H, m, H-7, -8, -9), 1.20 (2H, dt, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-10), 0.89 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12, -13); ^{13}C NMR data, see Table: HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1': H-2/C-1, C-4; H-5/C-3, C-4, C-6(-7); H-6/C-5, C-7(-8); H-11/C-12(-13); H-12(-13)/C-10, C-11; H-1'/C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2': HRFABMS $[M+Na]^+$ m/z 291.1950 (calculated for $C_{16}H_{28}O_3Na$, 291.1936).

Petrynol (95B-8-A): colorless oil, $[\alpha]_D^{25} +15.3^\circ$ (c0.08, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3350 (broad), 2925, 2870, 1740, 1620, 1440, 1205, 1010 cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 5.88 (1H, dt, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-5), 5.59 (1H, dd, $J = 15.1, 6.1$ Hz, H-4), 4.82 (1H, m, H-3), 3.65 (3H, s, OMe), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.29 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11), 2.05 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-6), 1.84 (1H, br s, OH), 1.59 (2H, m, H-10), 1.39 (2H, tt, $J = 7.3, 6.8$ Hz, H-7), 1.30 (4H, m, H-8, -9); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 174.2 (C, C-12), 134.3 (CH, C-5), 128.5 (CH, C-4), 83.3 (C, C-2), 74.0 (CH, C-1), 62.8 (CH, C-3), 51.5 (CH₃, OMe), 34.1 (CH₂, C-11), 31.8 (CH₂, C-6), 28.9 (CH₂, C-8), 28.7 (CH₂, C-9), 28.5 (CH₂, C-7), 24.9 (CH₂, C-10); HMBC correlations H-1/C-3, H-3/C-1, C-2, C-4, C-5; H-4/C-2, C-3, C-6; H-5/C-3, C-6, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7; H-11/C-9, C-10, C-12; OMe/C-12; HRCIMS $[M-NH_4]^+$ m/z 242.1762 (calculated for $C_{13}H_{24}NO_3$, 242.1756).

따. Petroraspaillyne A1의 구조변환 및 유도체의 전합성

Petroraspaillyne A1(95B-8-C)의 수소화 반응. 화합물 95B-8-C(4.2 mg)를 메탄올 (1.5 mL)에 녹이고 10% palladium-charcoal(4 mg)을 넣은 후에 실온의 수소대기 하에서 15시간 동안 반응시켰다. 촉매는 여과하여 제거하였으며 용매를 감압하에서 제거하여 perhydroraspaillyne A1이 4 mg 얻어 졌다. $[\alpha]_D -0.5^\circ$ (c 0.09, MeOH); 1H NMR(CD_3OD , 500 MHz) δ 3.73 (1H, quin., $J = 5.4$ Hz, H-2'), 3.57 (1H, dd, $J = 11.2, 4.9$ Hz,

H-3'), 3.50 (1H, dd, $J = 11.2, 5.9$ Hz, H-3'), 3.47 (1H, dd, $J = 10.0, 4.9$ Hz, H-1'), 3.45 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-1), 3.40 (1H, dd, $J = 10.0, 6.1$ Hz, H-1'), 1.56 (2H, quin., $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.33 (2H, m, H-2), 1.28 (16H, m), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-12). ^{13}C NMR(CD_3OD , 125 MHz) δ 73.2 (CH_2 , C-1'), 72.6 (CH_2 , C-1), 72.3 (CH, C-2'), 64.6 (CH_2 , C-3'), 33.1 (CH_2 , C-10), 27.2 (CH_2 , C-2), 23.8 (CH_2 , C-11), 14.5 (CH_3 , C-12): HREIMS [M] $^+$ m/z 260.2356 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{O}_3$, 260.2351).

Perhydropetroraspailline A1의 아세틸화 반응. Perhydropetroraspailline A1(3.5 mg)을 pyridine(0.3 mL)에 녹이고 acetic anhydride(0.2 mL)를 첨가한 후에 실온에서 3 시간 동안 저어 주었다. 질소가스를 이용하여 농축한 다음 HPLC(YMC ODS-A column, 0.5 cm x 15 cm, acetonitrile, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 15분에서 diacetate 유도체가 3.4 mg 얻어 졌다. mp 45-47 °C; $[\alpha]_D -11.6^\circ$ (c 0.15, MeOH): ^1H NMR(CD_3OD , 500 MHz) δ 5.15 (1H, m, H-2'), 4.32 (1H, dd, $J = 11.8, 3.8$ Hz, H-3'), 4.12 (1H, dd, $J = 11.8, 6.8$ Hz, H-3'), 3.57 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.54 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-1'), 3.47 (1H, dt, $J = 9.5, 6.6$ Hz, H-1), 3.43 (1H, dt, $J = 9.5, 6.6$ Hz, H-1), 2.04 (3H, s, OAc), 2.03 (3H, s, OAc), 1.56 (2H, quin., $J = 6.8$ Hz, H-2), 1.33 (2H, m, H-3), 1.28 (16H, m), 0.89 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-12).

Perhydropetroraspailline A1의 전합성. 가) (*R*)-(-)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol(116 mg, 0.878 mmol)을 DMF(10 mL)에 녹이고 NaH (23 mg, 0.958 mmol)을 첨가한 다음 1시간 동안 reflux한다. Bromododecane(0.3 mL, 1.250 mmol)을 syringe를 통해 넣고 다시 3시간 동안 reflux하였다. 감압 하에서 용매를 제거한 뒤 diethyl ether(40 mL)를 넣고 다시 이 유기층을 물로 씻고, diethyl ether를 저온 감압으로 제거하였다. 남은 잔류물을 THF(30 mL)에 녹이고 10% HCl(5 mL)를 첨가한 뒤에 실온에서 하룻밤 동안 교반시켰다. 용매를 제거한 후에 남은 반응물에 silica gel chromatography를 실시하였다(1 x 17 cm). 20% EtOAc/*n*-hexane으로 용리하여 반응하지 않은 bromododecane과 불순물을 제거하고 50% EtOAc/*n*-hexane로 용리하여 (*S*)-3-dodecyloxy-1,2-propandiol(76 mg, 33% yield)을 얻었다: $[\alpha]_D -0.1^\circ$ (c 2.0, MeOH). 나) (*S*)-3-dodecyloxy-1,2-propandiol(28 mg)을 pyridine(0.5 mL)에 녹이고 acetic anhydride(24 mg)을 첨가한 후에 실온에서 3시간 동안 저어 주었다. 질소가스를 이용하여 농축한 다음 HPLC(YMC C_{18} column, acetonitrile, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 15분에서 diacetate 유도체가 23 mg 얻어 졌다. 이 물질의 ^1H NMR data는 petroraspailline A1의 구조 변환으로 얻어진 물질과 동일하였다. $[\alpha]_D -9.6^\circ$ (c 1.15, MeOH).

바. Petrynol의 입체구조 결정

(*S*)-MTPA Ester of Petrynol. 물질 95B-8-A 1.7 mg을 0.5 ml의 dry pyridine에 녹인 후에 20 μ L의 (-)-MTPA chloride(methoxy- α, α, α -trifluoromethylphenylacetic acid chloride)를 가하였다. 이 용액을 상온에서 N_2 대기 하에서 1-3 시간 방치하면서 silica TLC로 반응의 진행을 확인하였다. 에스터화 반응이 이루어진 것을 출발물질의 소멸로서 확인한 후에 0.5 mL의 H_2O , 0.3 mL의 CH_2Cl_2 , 1 mL의 MeOH을 순서대로 가하고 10 분간 방치하였다. 여분의 용매와 기타의 액체성분을 감압 하에서 제거한 후에 남은 갈색의 반고형 성분을 2 mL의 30% EtOAc/*n*-hexane 용액에 녹인 후 silica Sep-pak을 통과시켰다. 용리액은 다시 역상 HPLC(YMC ODS column, 1 cm x 25 cm, 100% MeCN)로 분리하여 반고형상의 순수한 petrynol의 (*S*)-MTPA ester(95B-8-AS)를 획득하였다: 1H NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.54 (2H, m, Ar), 7.44-7.38 (3H, m, Ar), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 6.01 (1H, br dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-3), 5.60 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 3.66 (3H, s, OMe), 3.56 (3H, s, OMe), 2.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.30 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-11), 2.09 (2H, ddt, $J = 6.8, 1.5, 7.3$ Hz, H-6), 1.61 (2H, quin., $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.40 (2H, quin., $J = 7.3$ Hz, H-7), 1.31-1.29 (4H, m, H-8, -9); HRFABMS [$M+Na$] $^+$ m/z 463.1731 (calculated for $C_{23}H_{27}F_3O_5Na$, 463.1708).

(*R*)-MTPA Ester of Petrynol. 물질 95B-8-AS와 동일한 방법으로 합성되었다. 물질 95B-8-A 1.1 mg과 20 μ L의 (+)-MTPA chloride로부터 0.9 mg의 (*R*)-MTPA ester인 95B-8-AR가 만들어 졌다: 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.54 (2H, m, Ar), 7.44-7.38 (3H, m, Ar), 6.03 (1H, br d, $J = 6.8$ Hz, H-3), 6.00 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 3.66 (3H, s, OMe), 3.59 (3H, s, OMe), 2.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.30 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-11), 2.05 (2H, ddt, $J = 6.8, 1.5, 7.3$ Hz, H-6), 1.60 (2H, quin., $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.37 (2H, quin., $J = 7.3$ Hz, H-7), 1.29 (4H, m, H-8, -9); Δ (δ AS- δ AR) H-1, -20.5 Hz; H-3, -8.8 Hz; H-4, +52.7 Hz; H-5, +32.3 Hz; H-6, +19.8 Hz; H-7, -16.1 Hz; H-10, -2.9 Hz; H-11, +1.5 Hz.

File:2029612 Ident:1_9 Mer Def 0.25 Acq: 2-FEB-1996 14:01:39 +0:53 Cal:2029601_1
ZAB-SE4F FAB+ Magnet BpM:154 BpI:4216495 TIC:42005708 Flags:NORM
File Text:Shin (KORDI) 91K-1-H MEOH/NBA/NACL

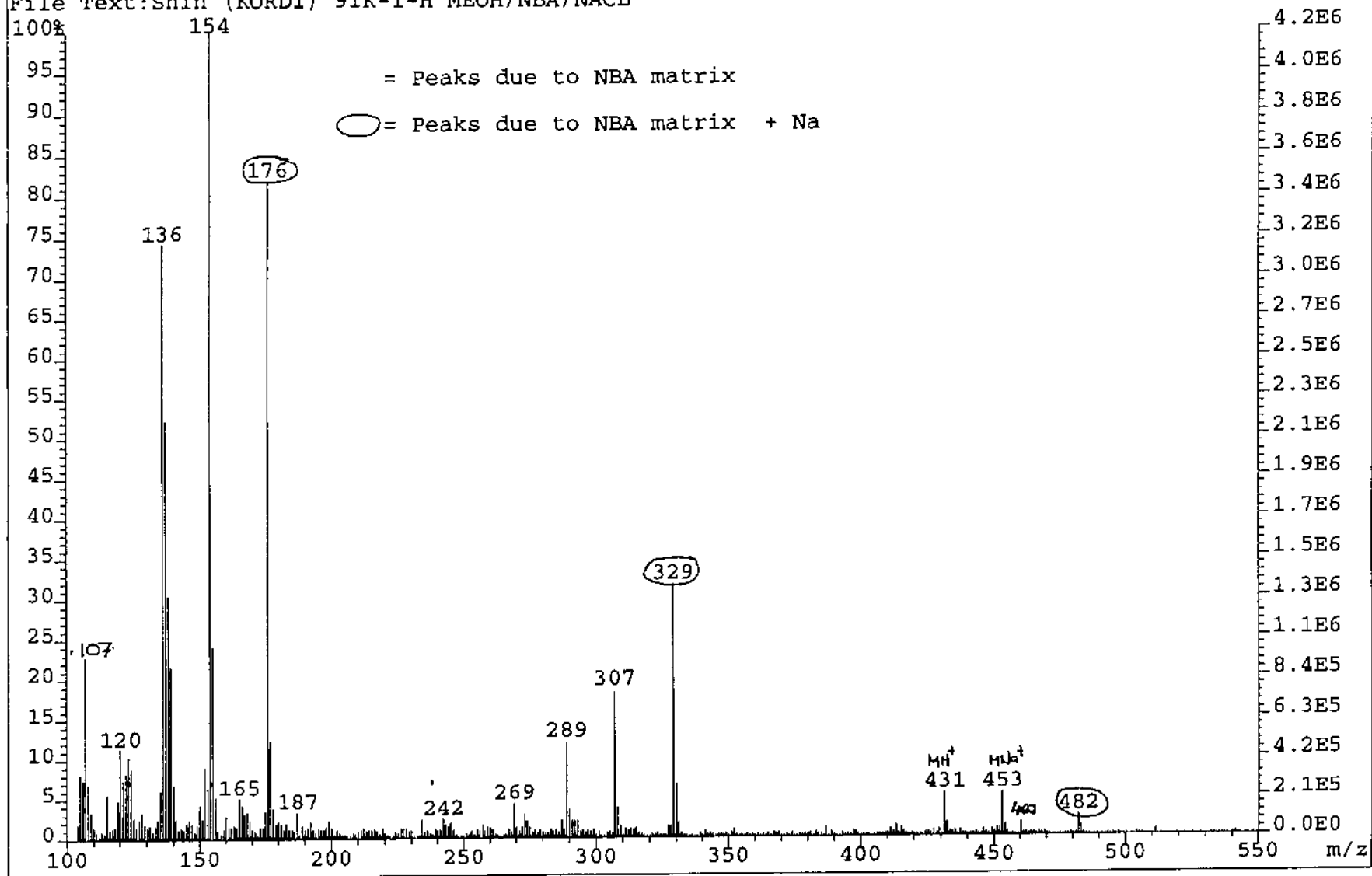


Fig. 3-4. HRFABMS spectrum of petrosiacylene A (95B-8-H).

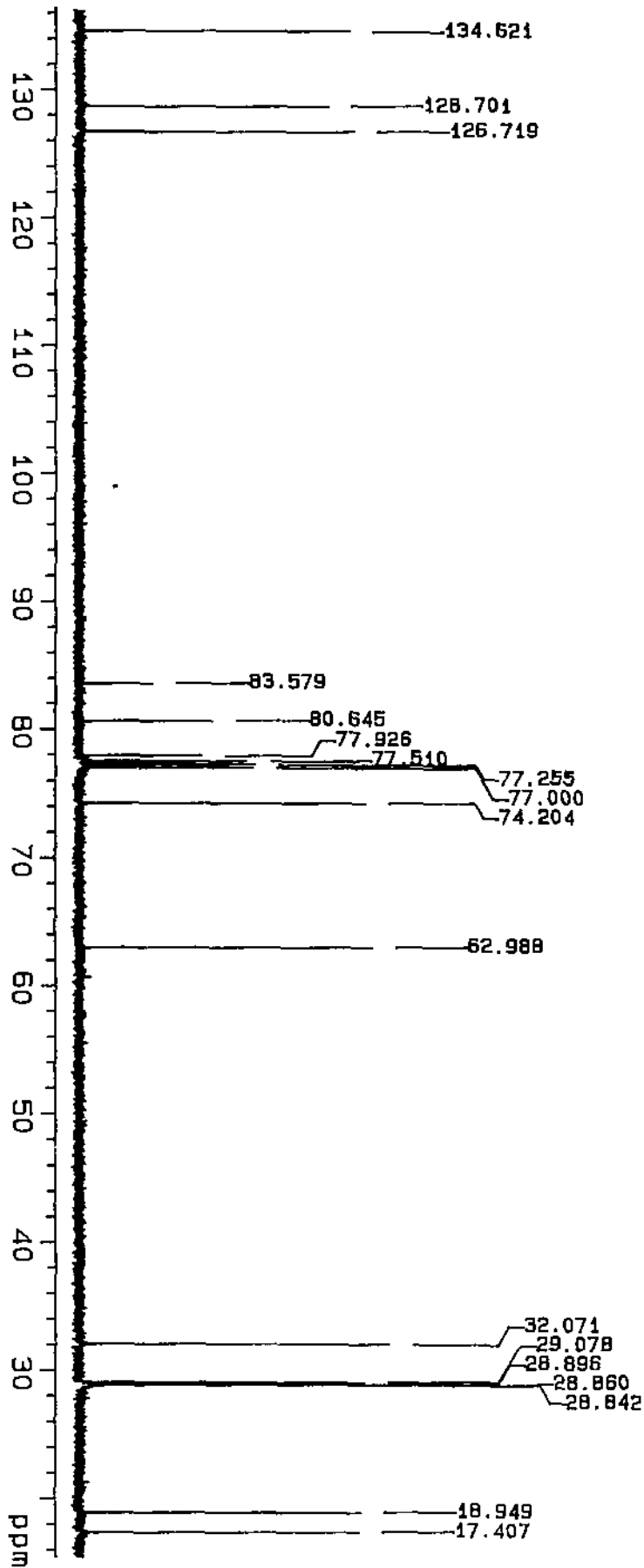


Fig. 3-5. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).

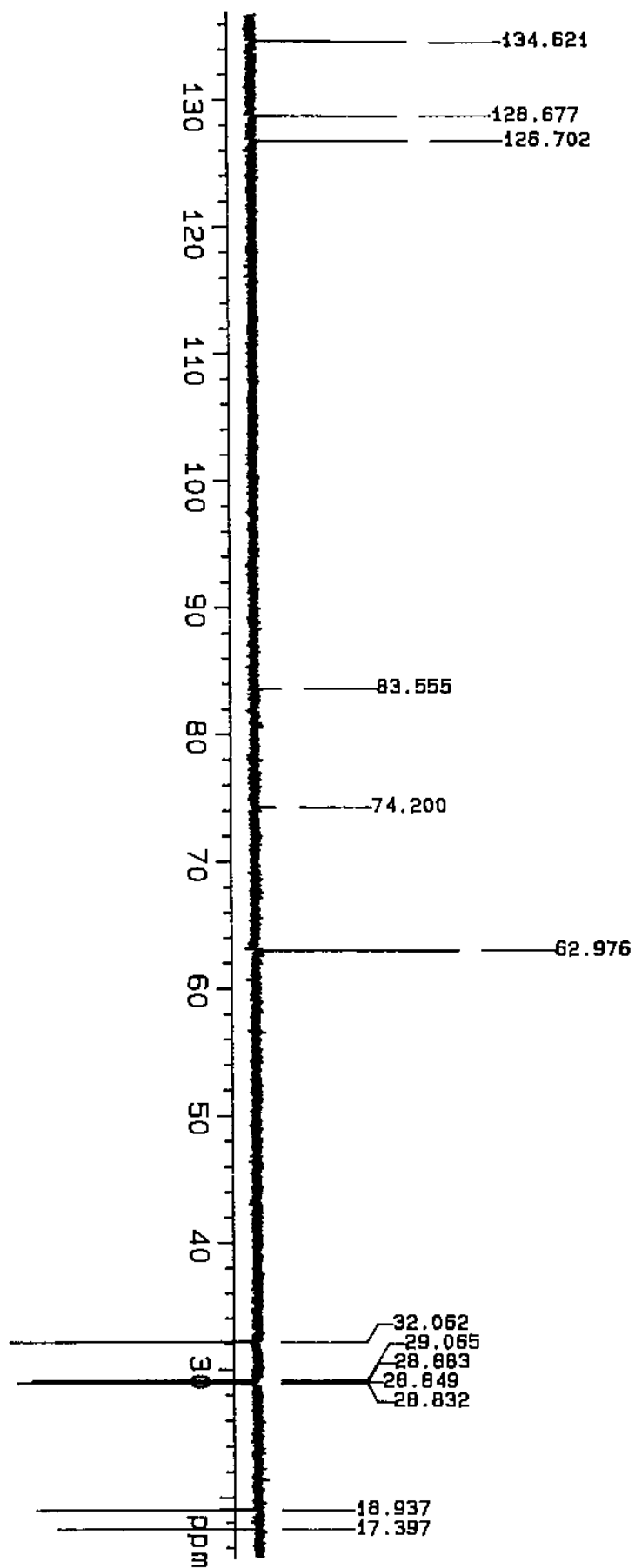


Fig. 3-6. DEPT spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).

917-1-rfc2, 3-rp19-rp3-p

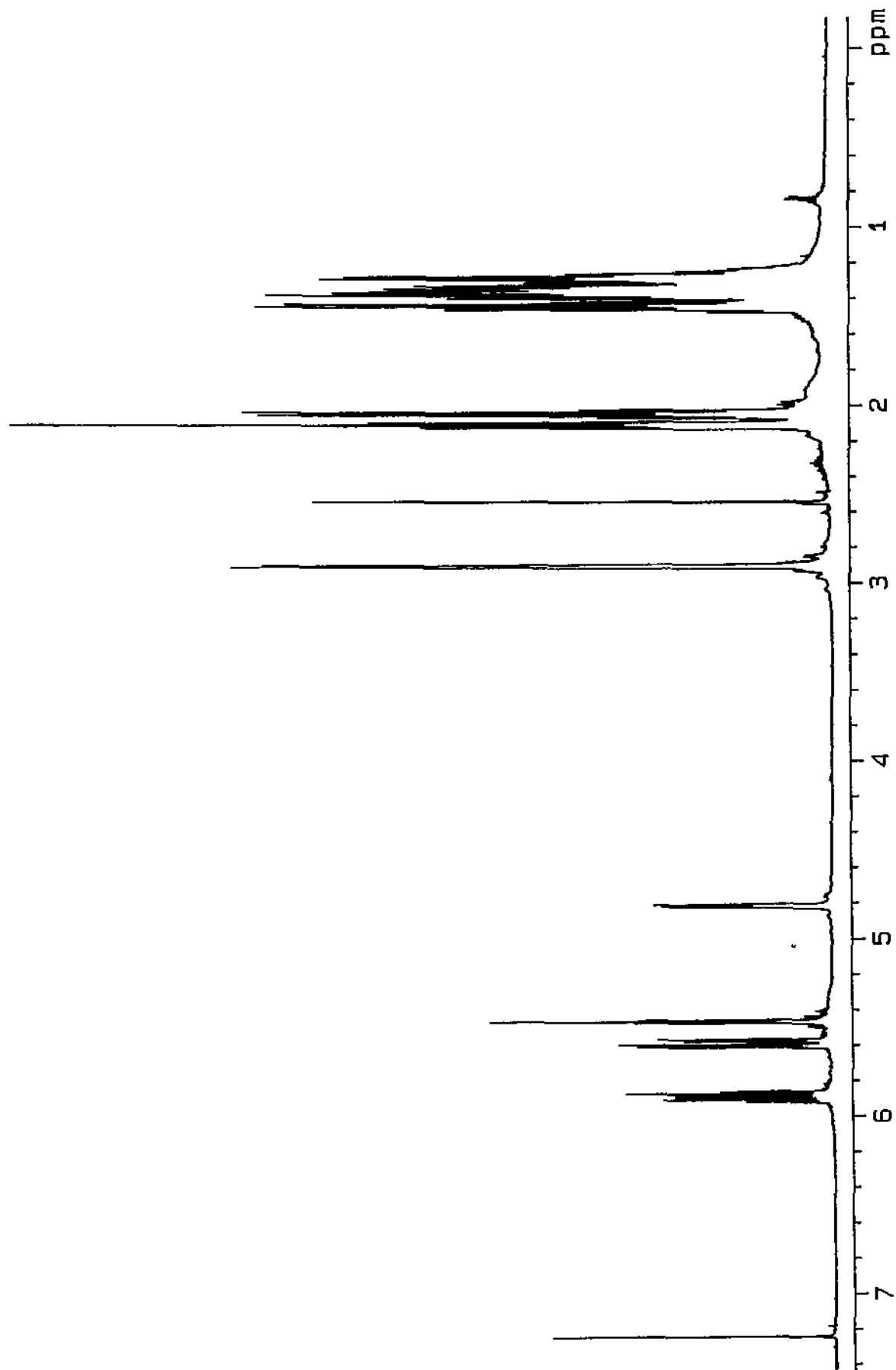


Fig. 3-7. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).

917-1-rfc2, 3-rp19-np3-cosy45

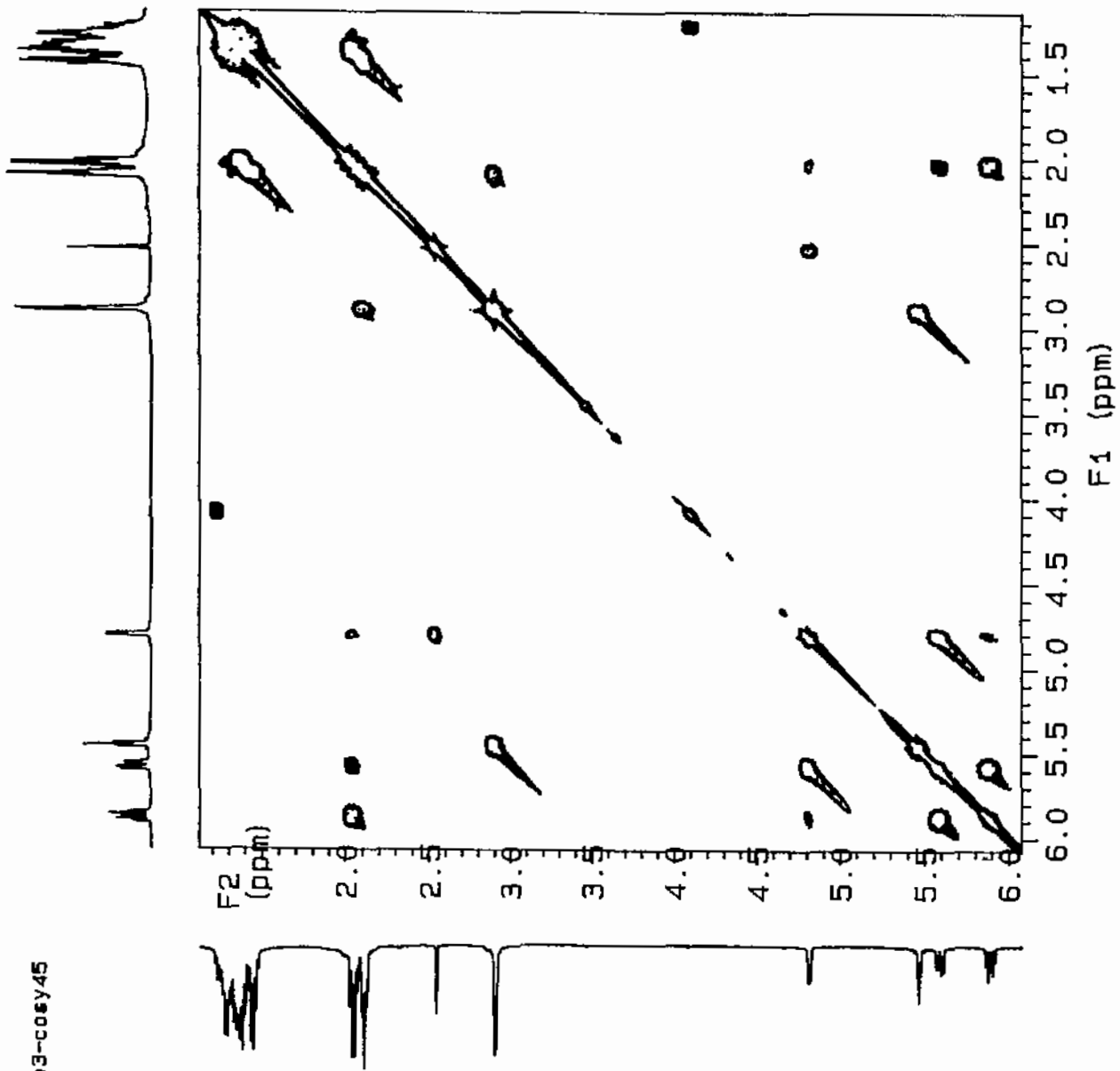


Fig. 3-8. Proton COSY spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).

917-1-rfc2, 3-rp19-np3-hmqc

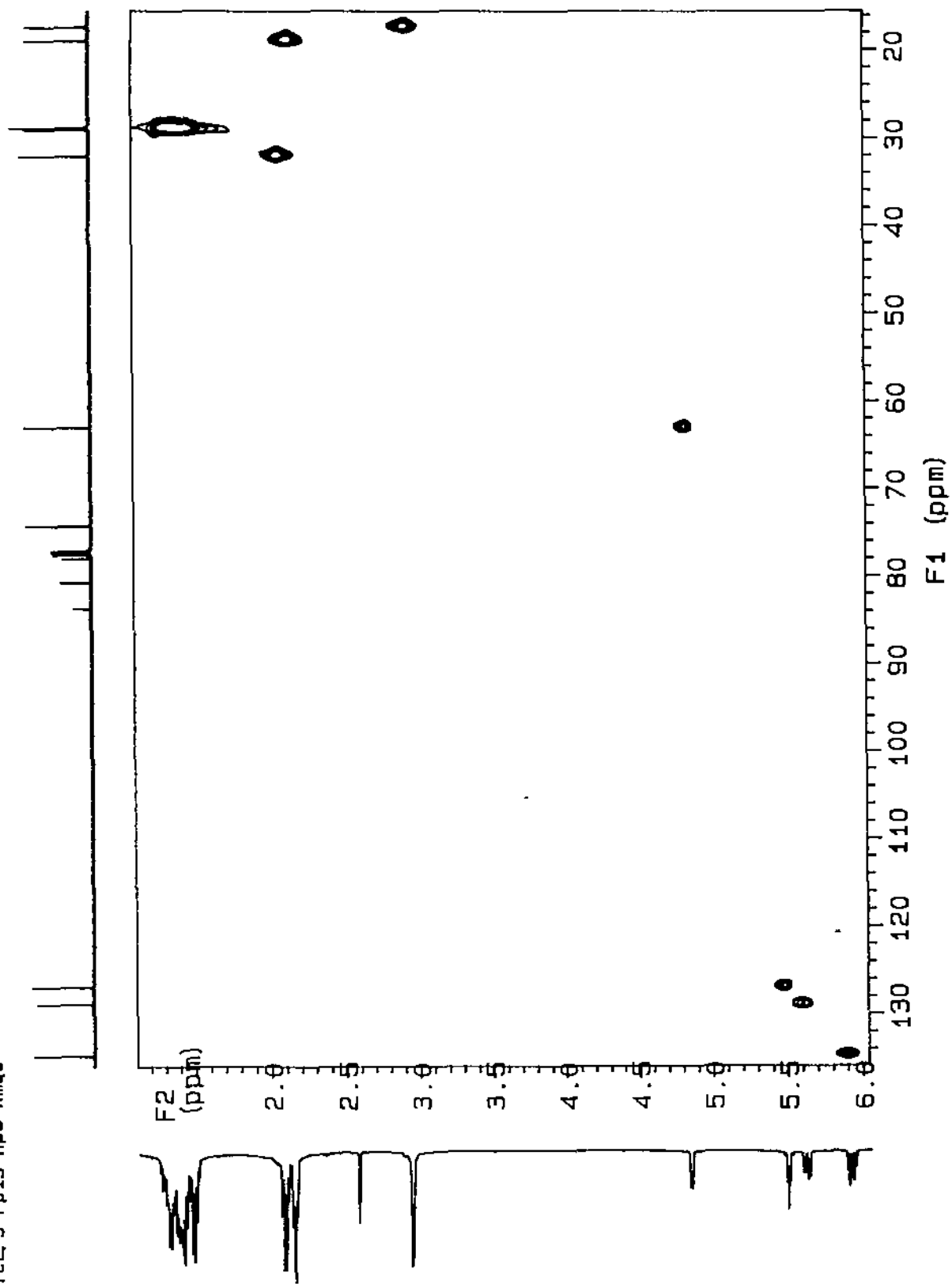


Fig. 3-9. HMQC spectrum of petrosiacetylene A(95B-8-H).

File:7119605 Ident:8_21 Mer Def 0.25 Acq:11-JUL-1996 08:33:29 +2:48 Cal:7119601_1
ZAB-SE4F FAB+ Magnet BpM:176 BpI:9027256 TIC:101790784 Flags:NORM
File Text:Shin (Kordi) 95B-8-O MEOH/NBA/NACL

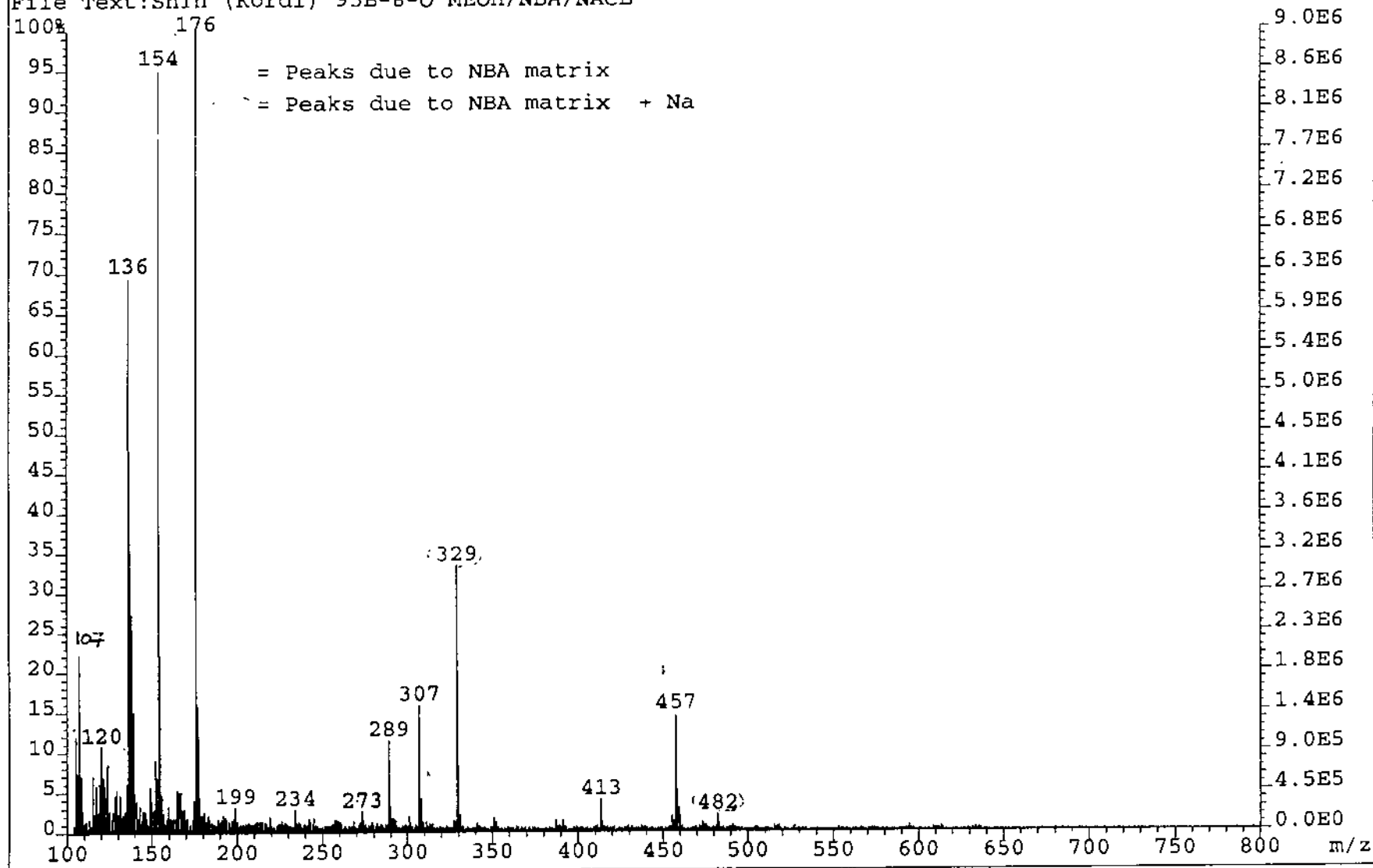


Fig. 3-10. HRFABMS spectrum of petrosiacylene B (95B-8-O).

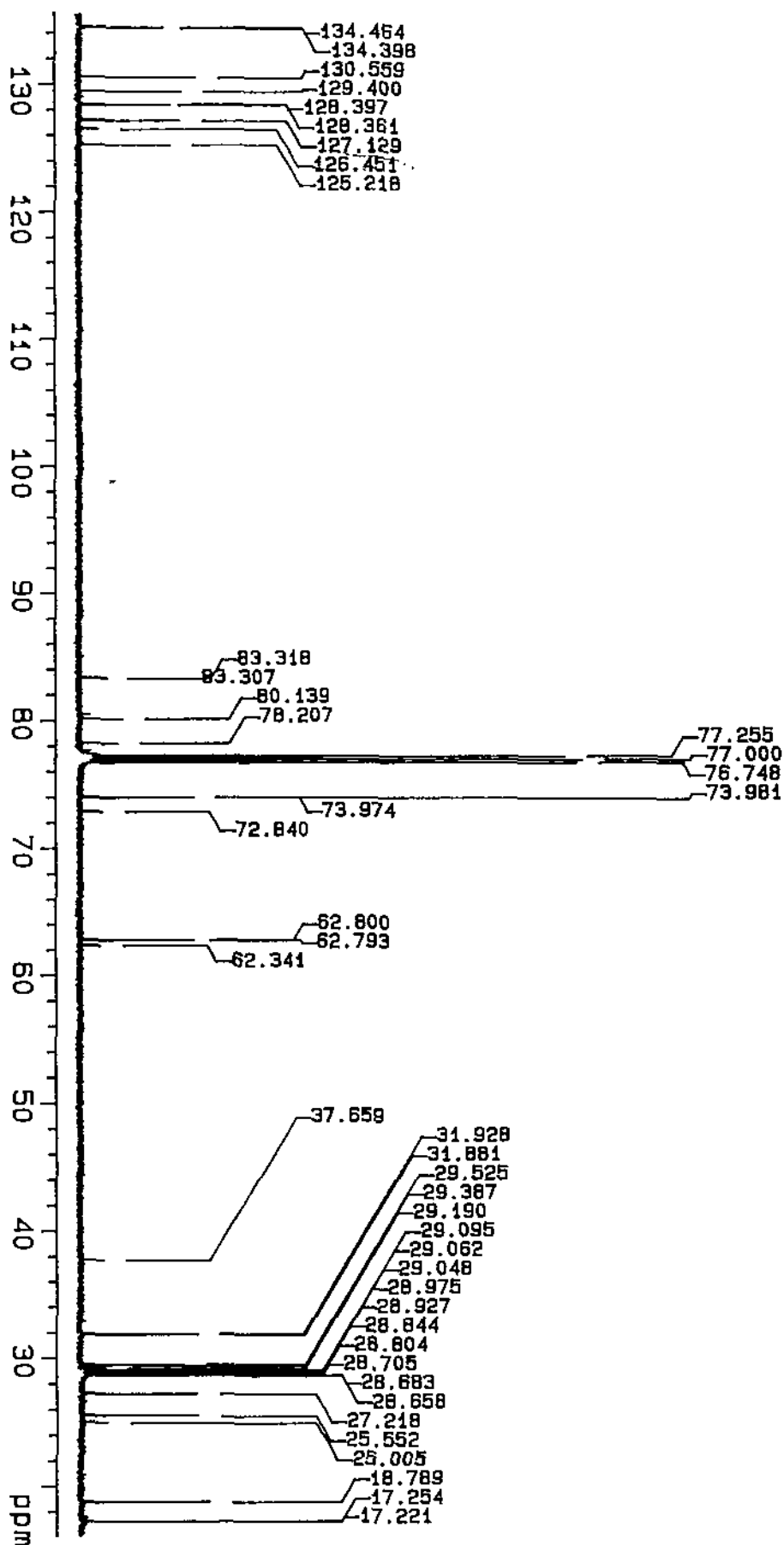


Fig. 3-11. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-D).

95B-8-MeOH-rfc9-rp13-rp12-p

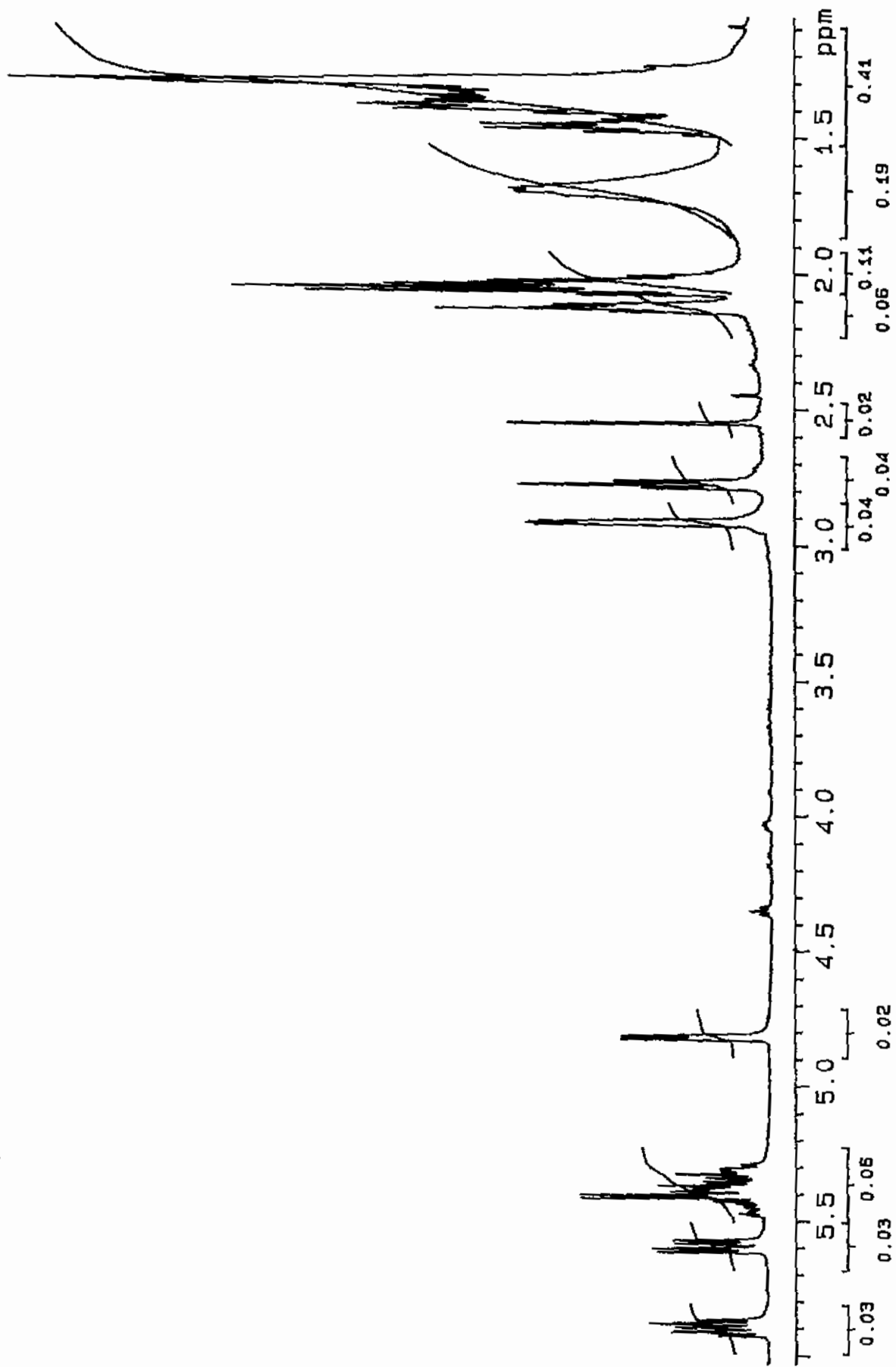


Fig. 3-12. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-0).

95B-8-MeOH-rfc3-rp13-rp12-cosy45

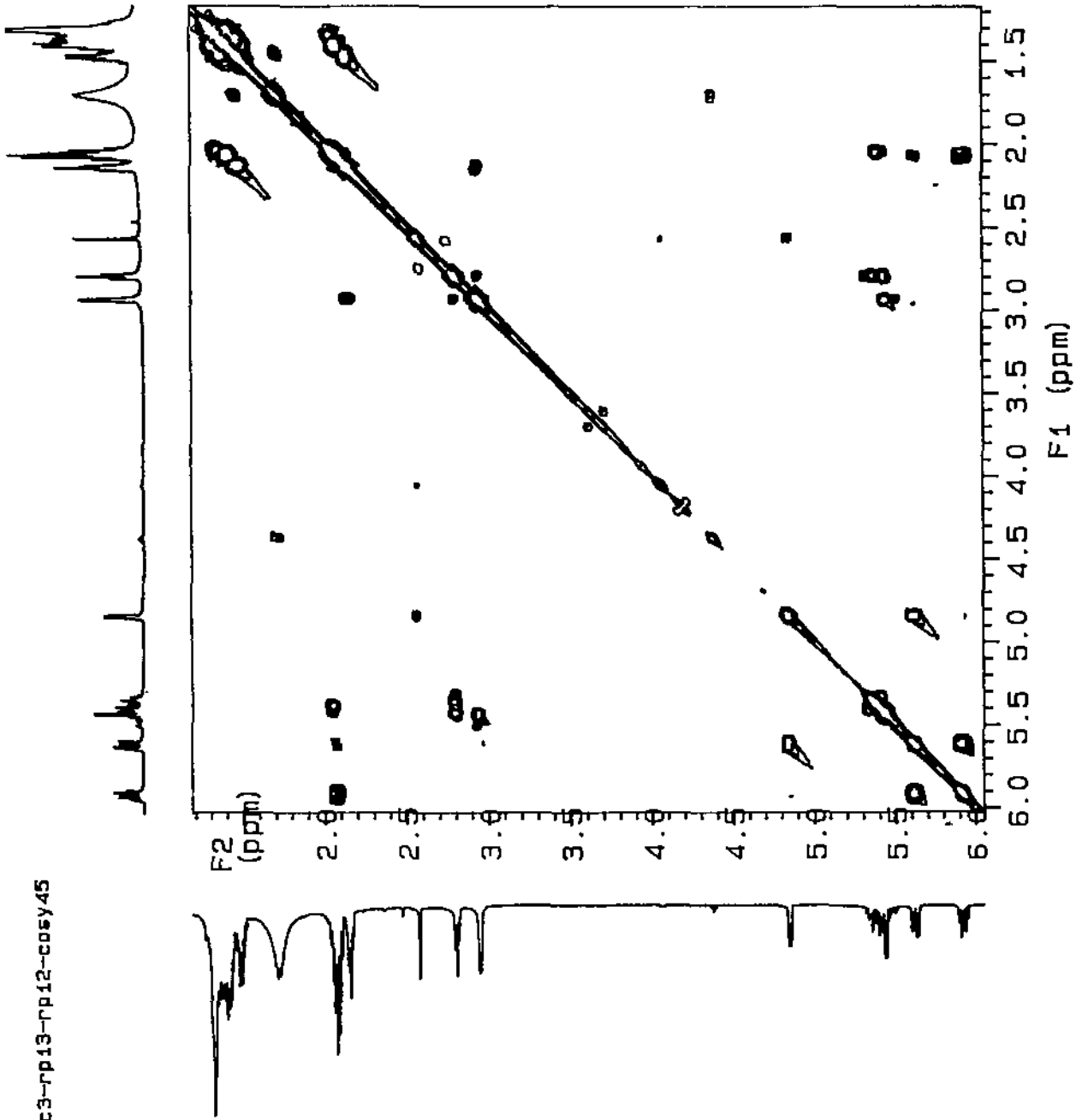


Fig. 3-13. Proton COSY spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-0).

95B-8-MeOH-rfc3-rp13-rp12-hmqc

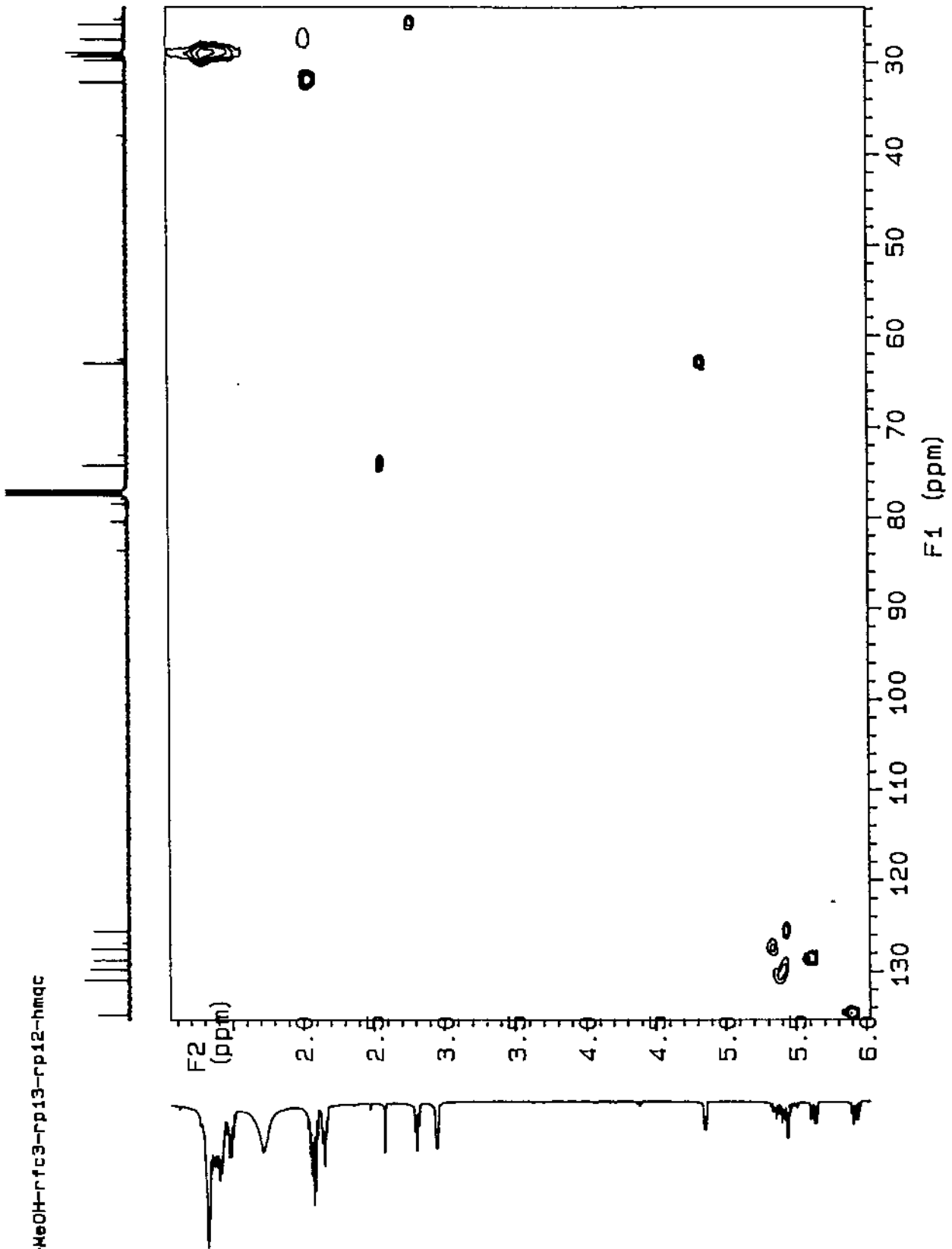


Fig. 3-14. HMQC spectrum of petrosiacetylene B(95B-8-0).

File:11199607B Ident:15 Mer Def 0.25 Acq:19-NOV-1996 13:38:24 +1:42 Cal:11199601B_1
70S CI+ Magnet BpM:44 BpI:751872 TIC:12802128 Flags:NORM
File Text:Shin (KORDI) 917-1-N DCI (NH3)

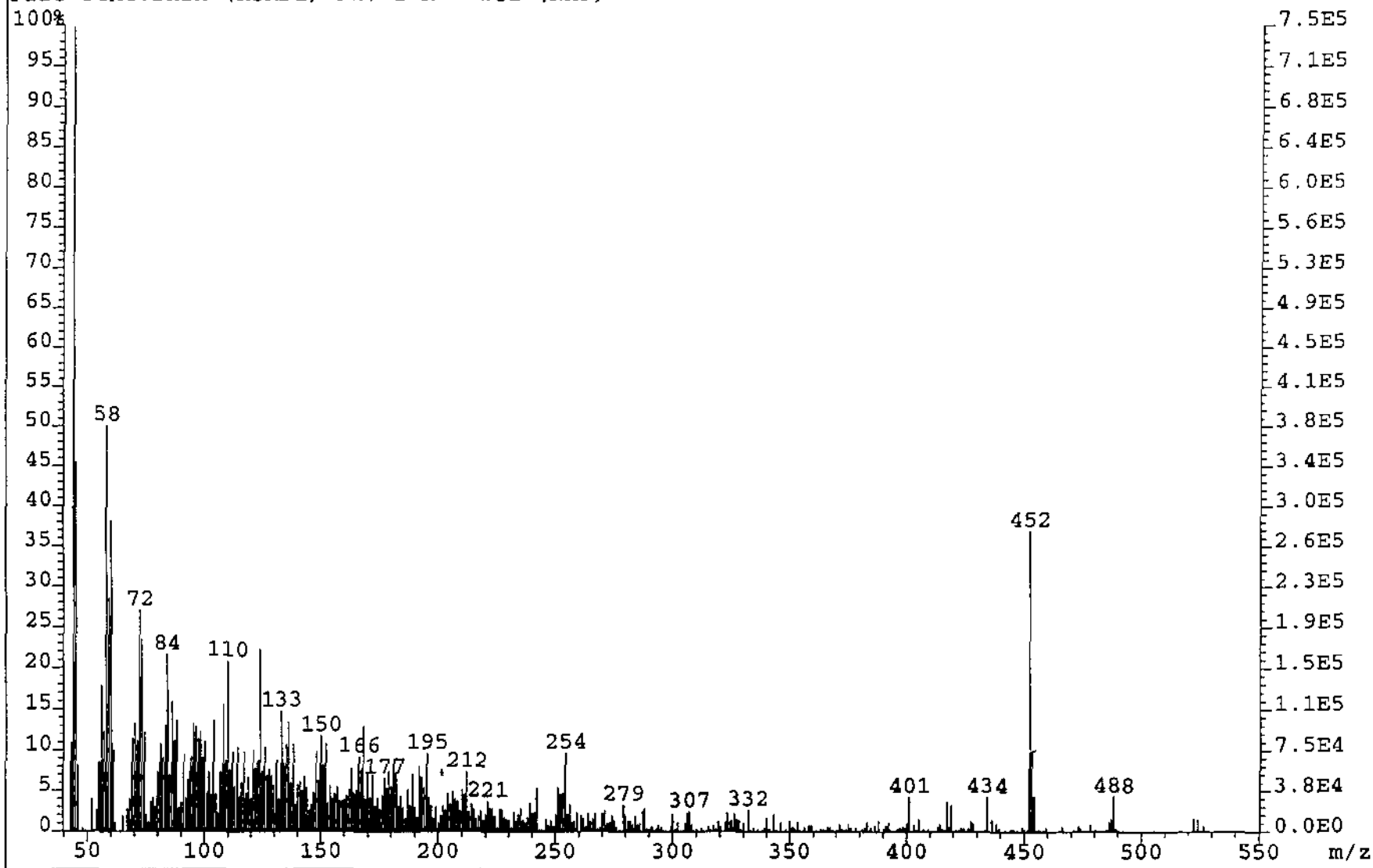


Fig. 3-15. HRDCIMS spectrum of petrosiacylene C(95B-8-N).

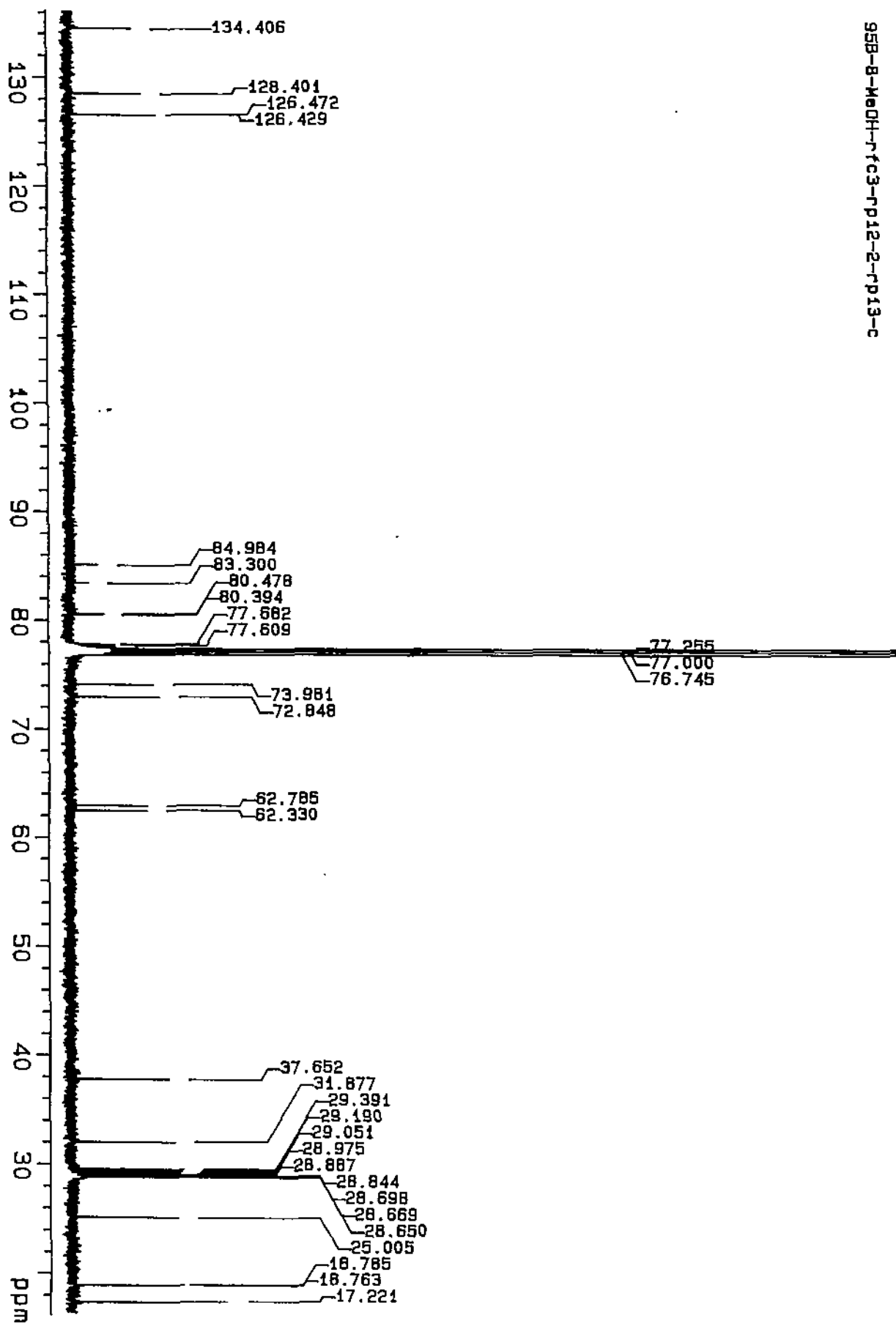


Fig. 3-16. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene C(95B-8-N).

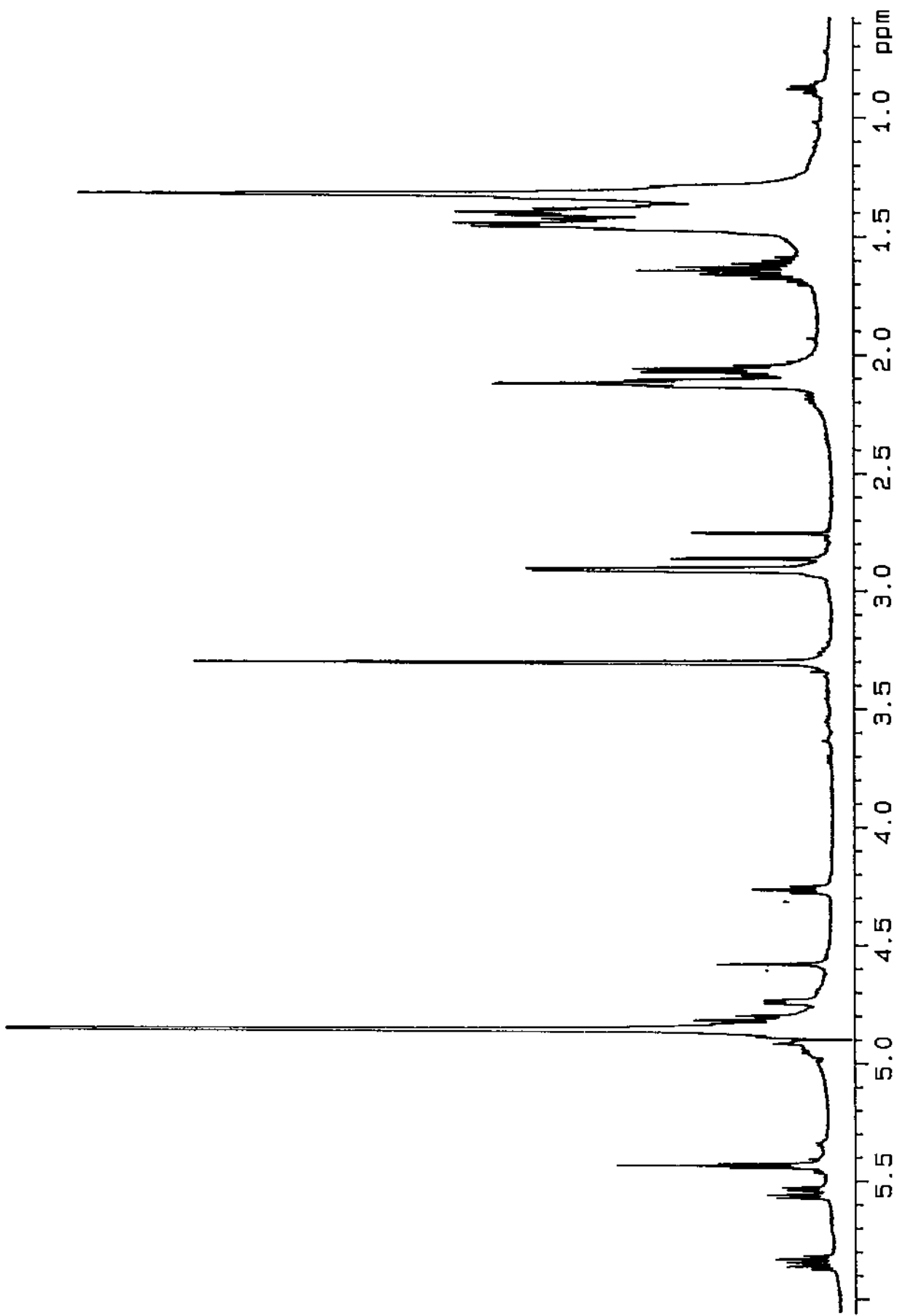


Fig. 3-17. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene C(95B-8-N).

File:7119613 Ident:20_30 Mer Def 0.25 Acq:11-JUL-1996 11:32:31 +4:17 Cal:7119601_1
 ZAB-SE4F FAB+ Magnet BpM:154 BpI:4685401 TIC:64208584 Flags:HALL
 File Text:Shin (Kordi) 9 5B-8-P MEOH/NBA/KCL

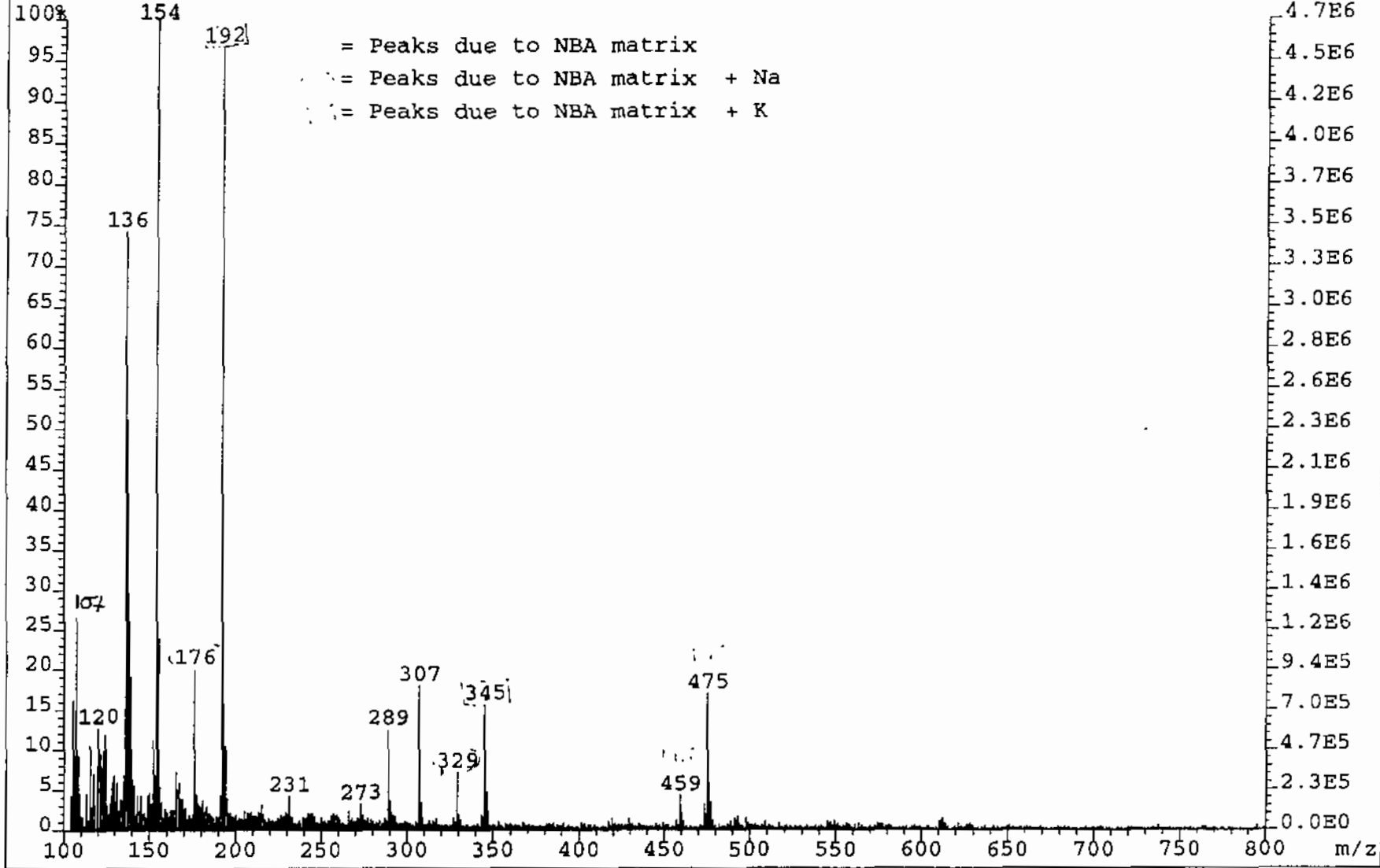


Fig. 3-18. HRFABMS spectrum of petrosiacylene D(95B-8-P).

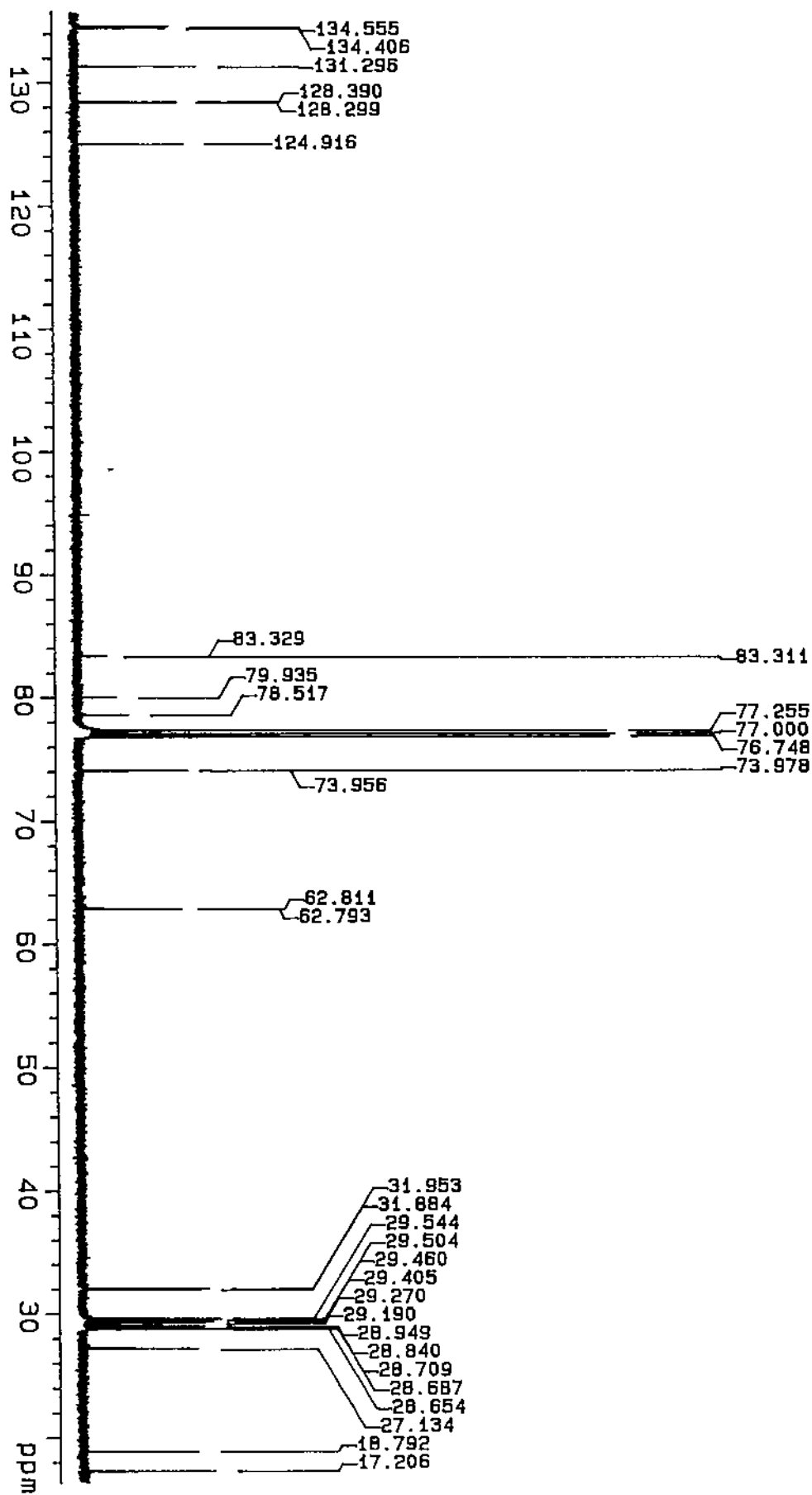


Fig. 3-19. Carbon NMR spectrum of petrosiacetylene D(95B-8-P).

95B-8-MeOH-rfc9-rp16-rp16-p

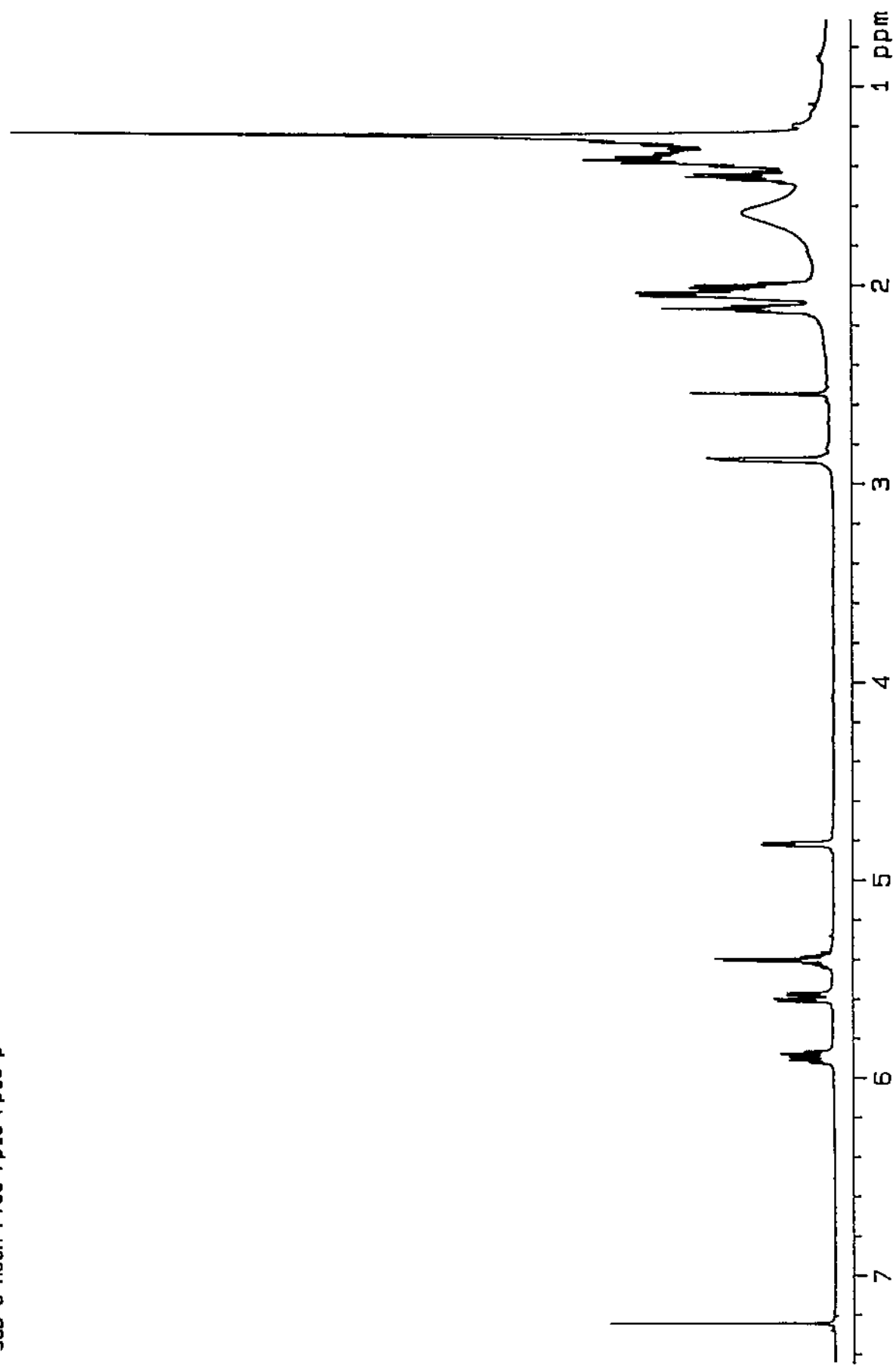


Fig. 3-20. Proton NMR spectrum of petrosiacetylene D(95B-8-P).

[Mass Spectrum]

Data : K9707018001

Date : 18-Jul-97 10:17

Sample : -KORDI:SYW_917-1H-S-nBU

Note : -in MeOH with NBA

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.05 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.4 deg.C

BP : m/z 79.2777

Int. : 1599.92

Output m/z range : 199.7033 to 700.5786

Cut Level : 0.00 %

13406962

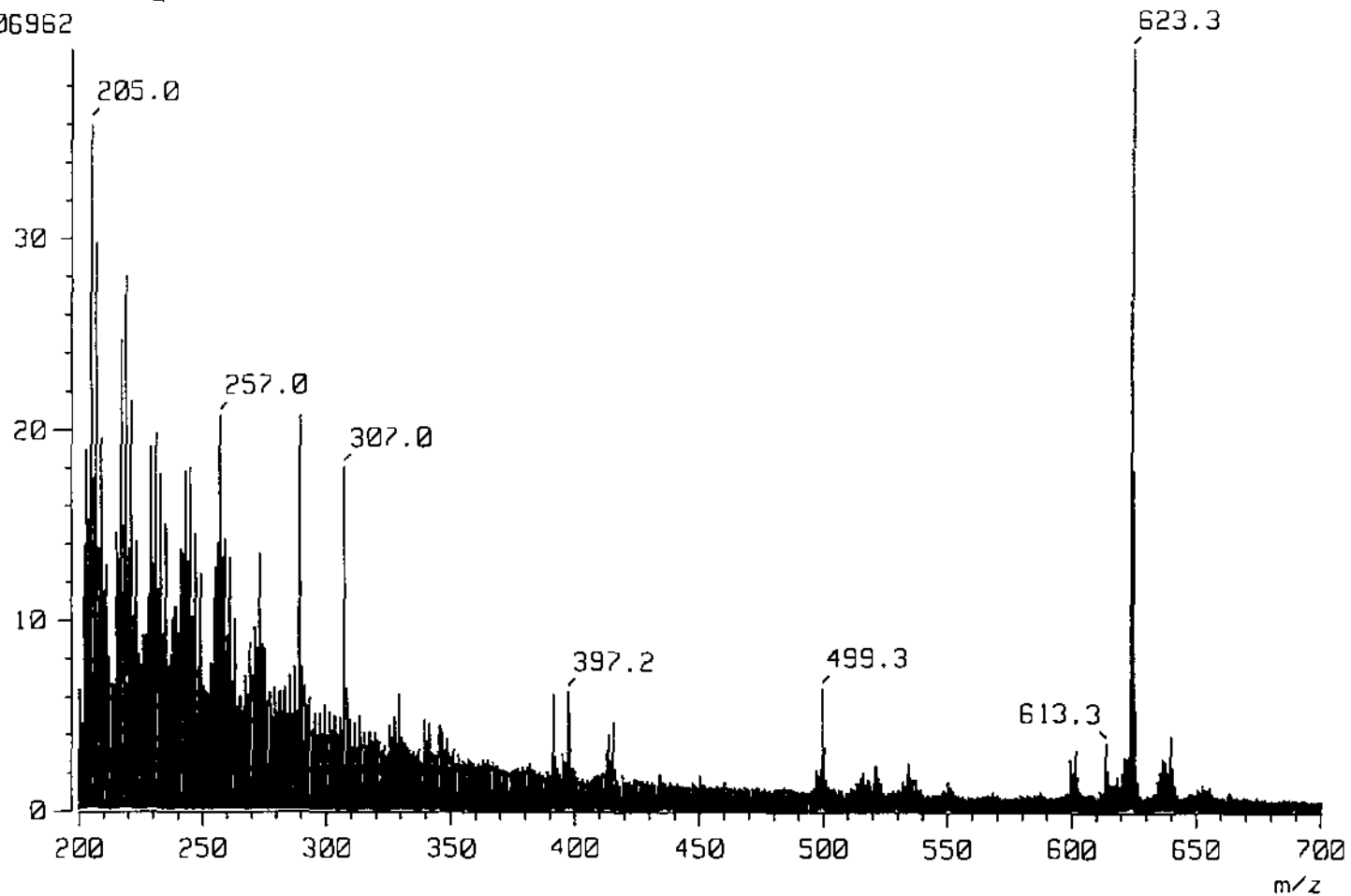


Fig. 3-21. HRFAB/MS spectrum of compound 95B-8-HS.

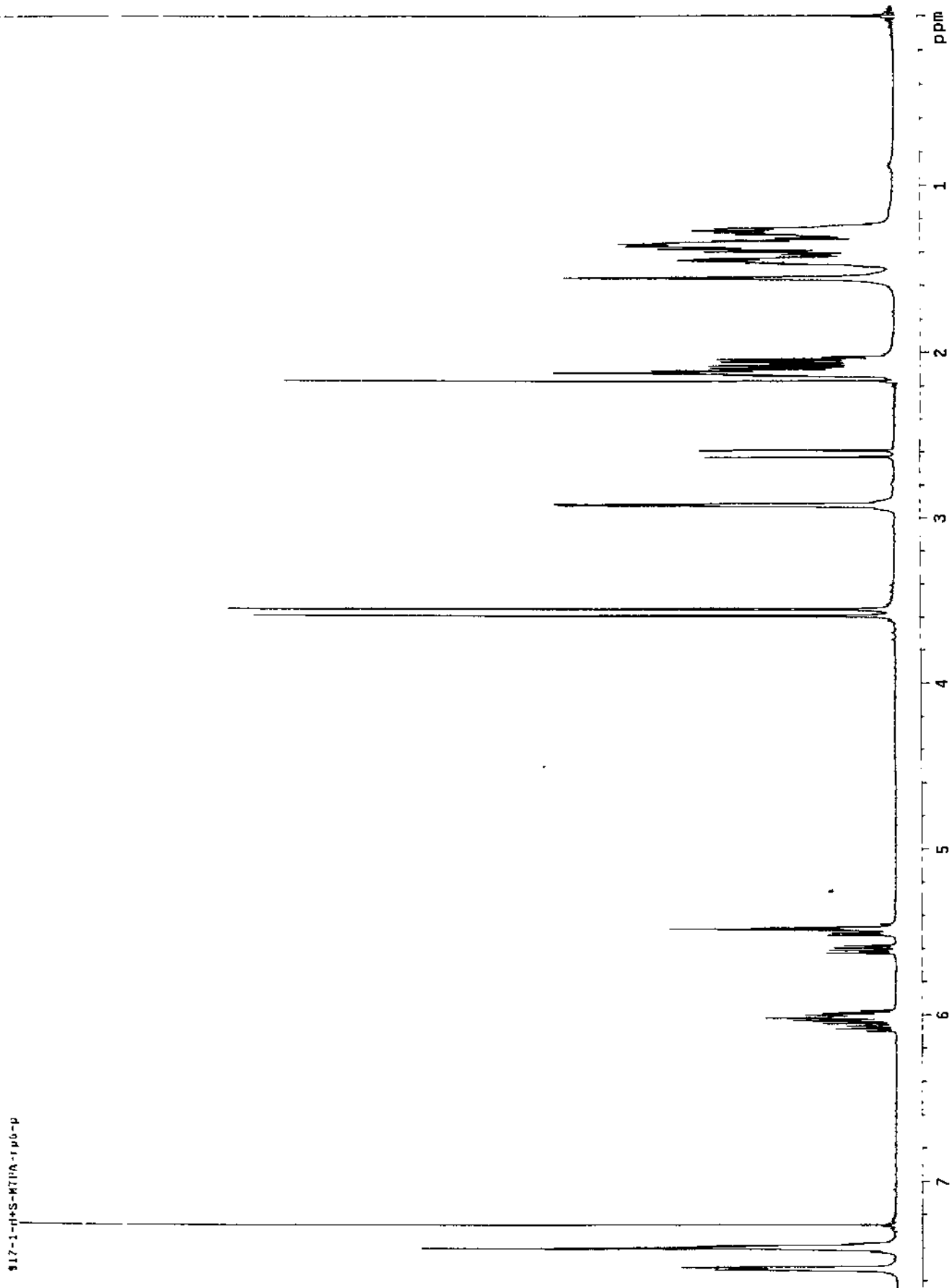


Fig. 3-22. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HS.

917-1-HR-NTPA-75-P

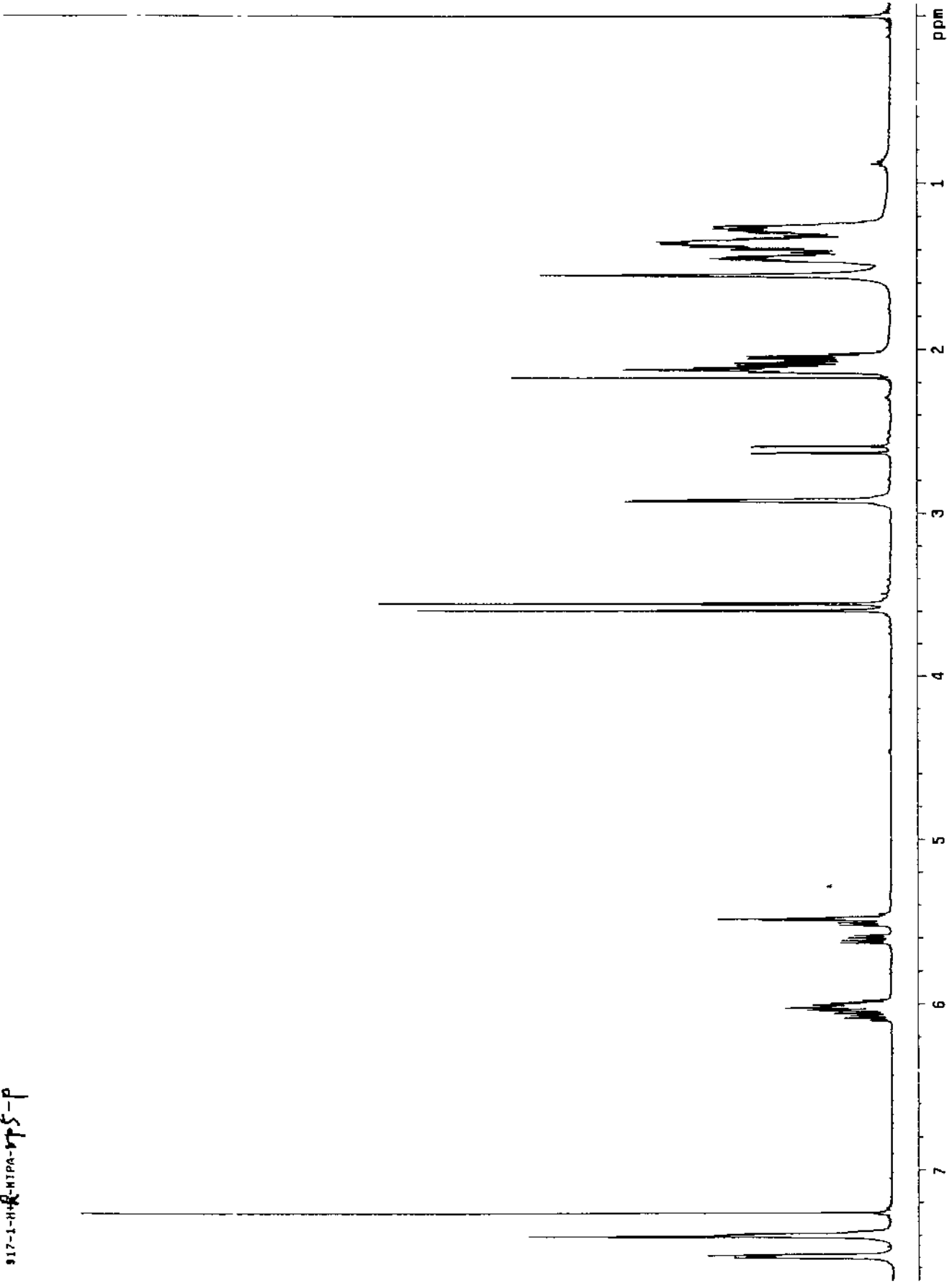


Fig. 3-23. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HR.

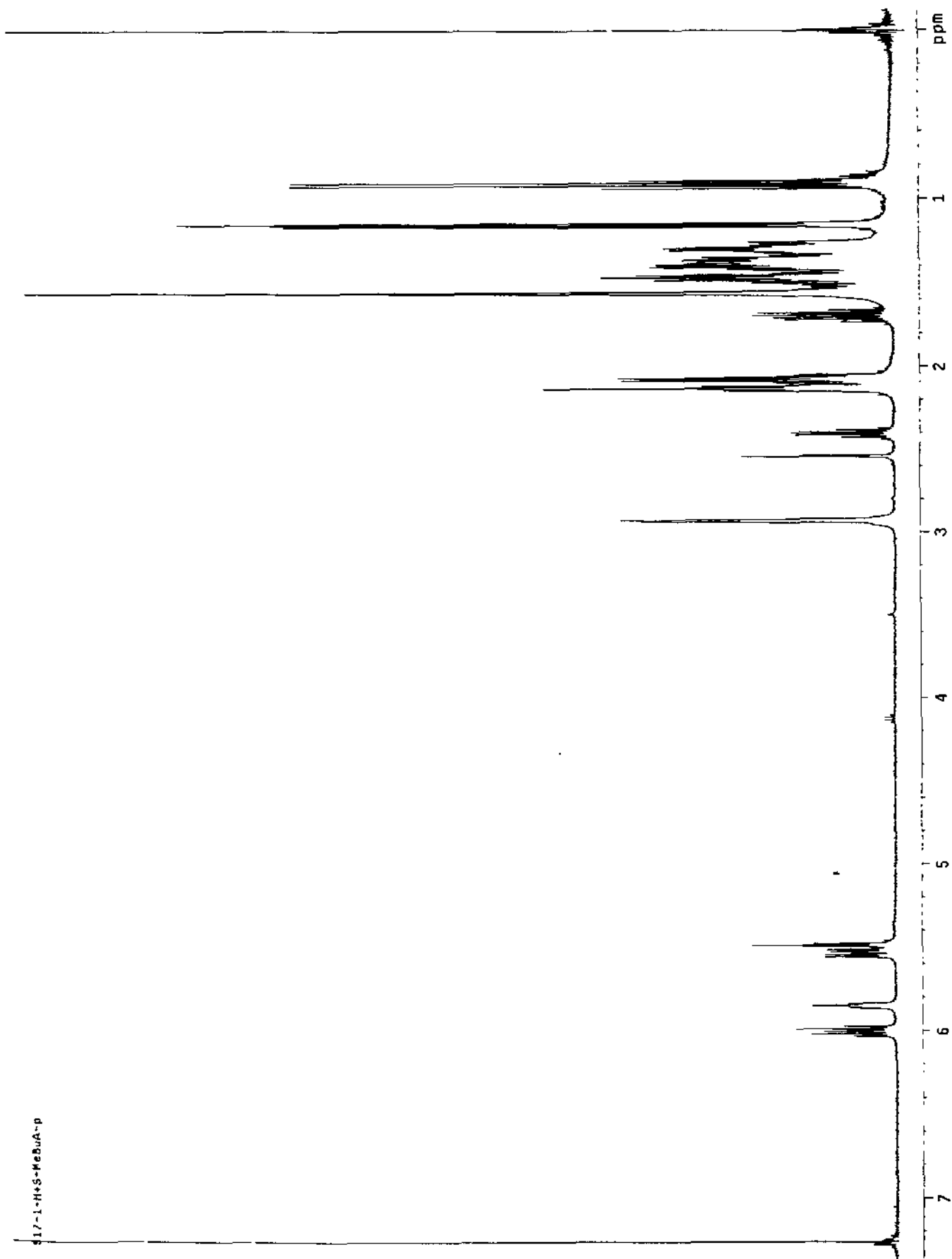


Fig. 3-24. Proton NMR spectrum of compound 95B-8-HX.

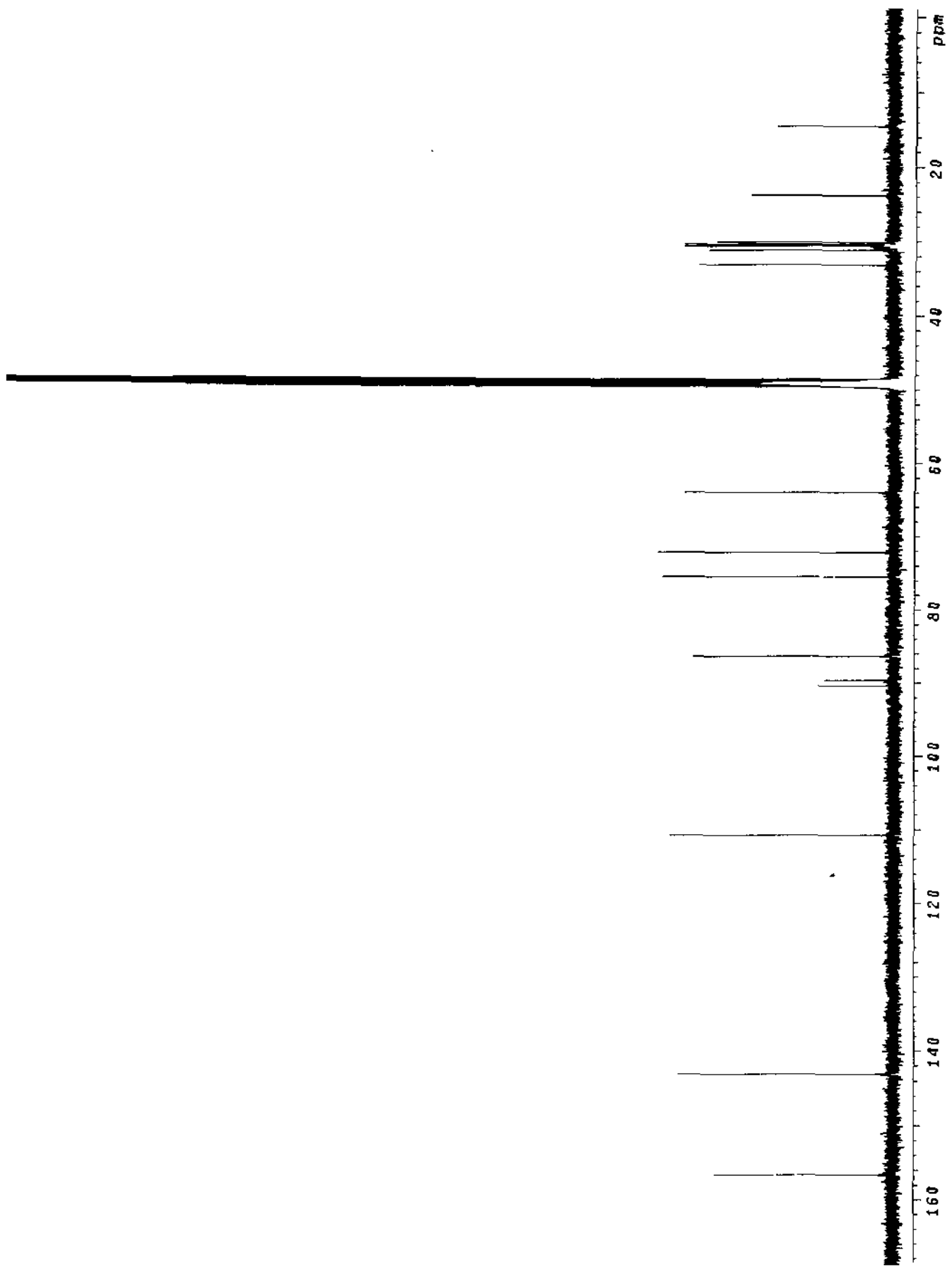


Fig. 3-25. Carbon NMR spectrum of raspailyne B1(95B-8-E).

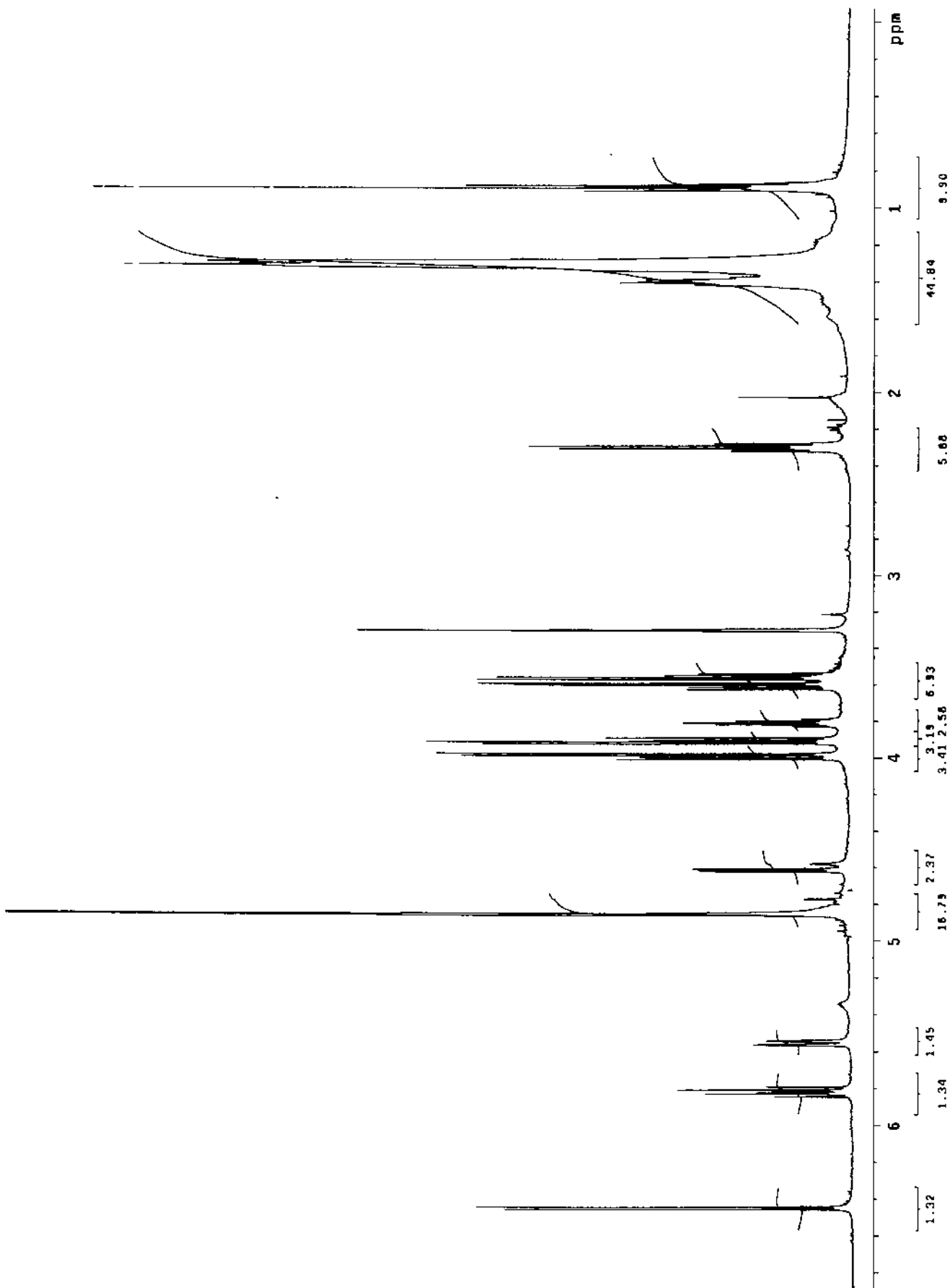


Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of raspailyne BI(95B-8-E).

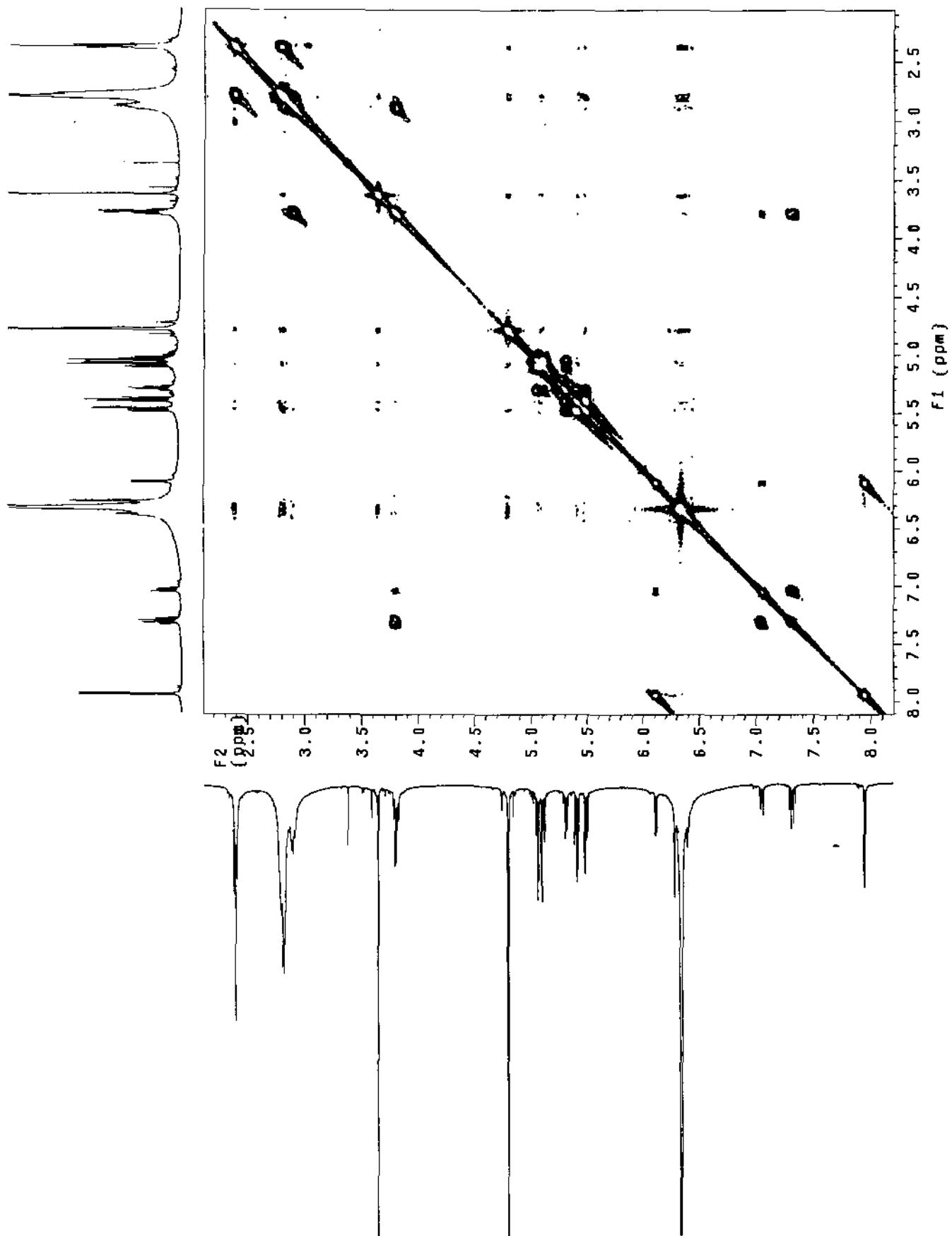


Fig. 3-27. Proton COSY spectrum of raspailyne BI(95B-8-E).

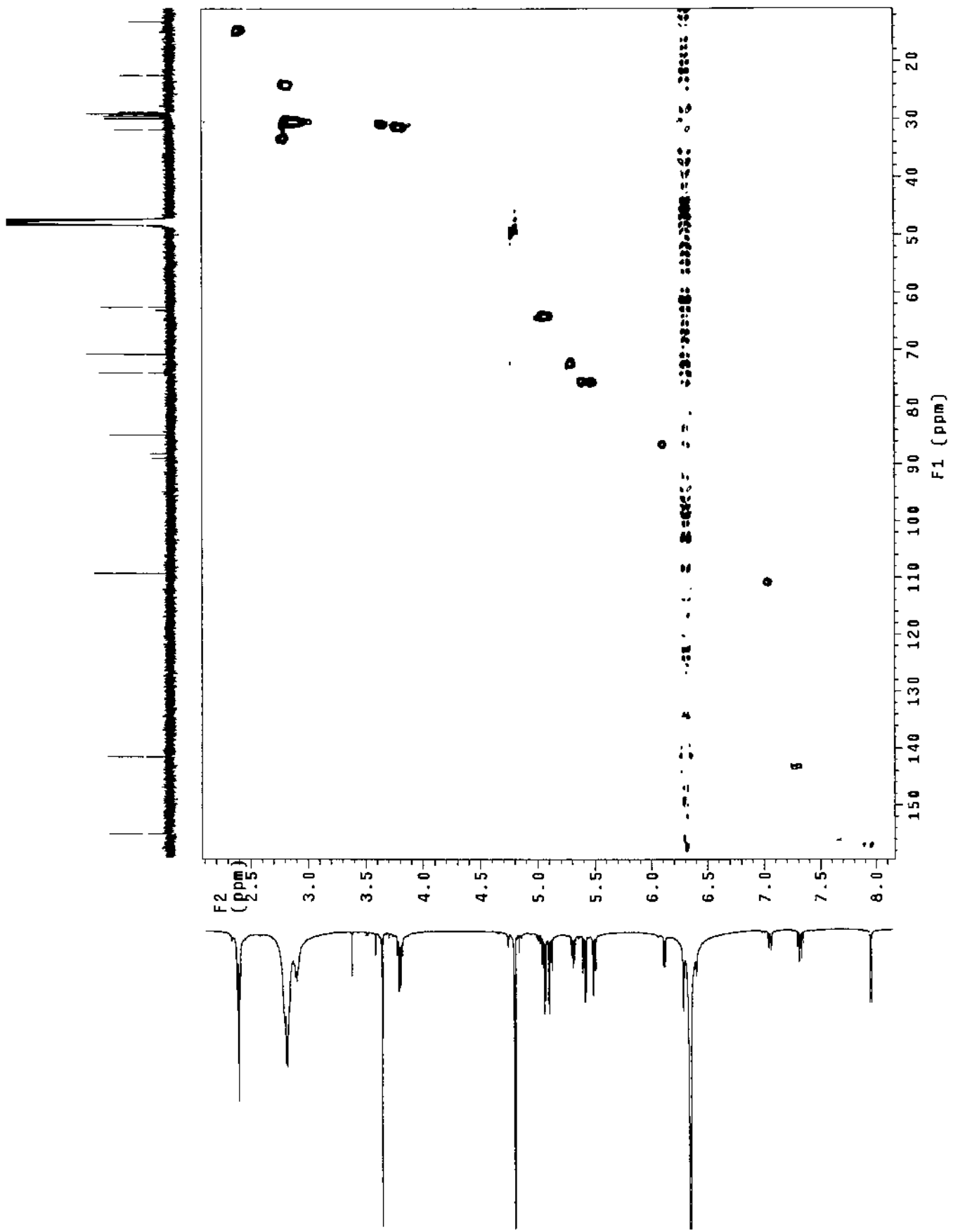


Fig. 3-28. HMQC spectrum of raspailyne B1(95B-8-E).

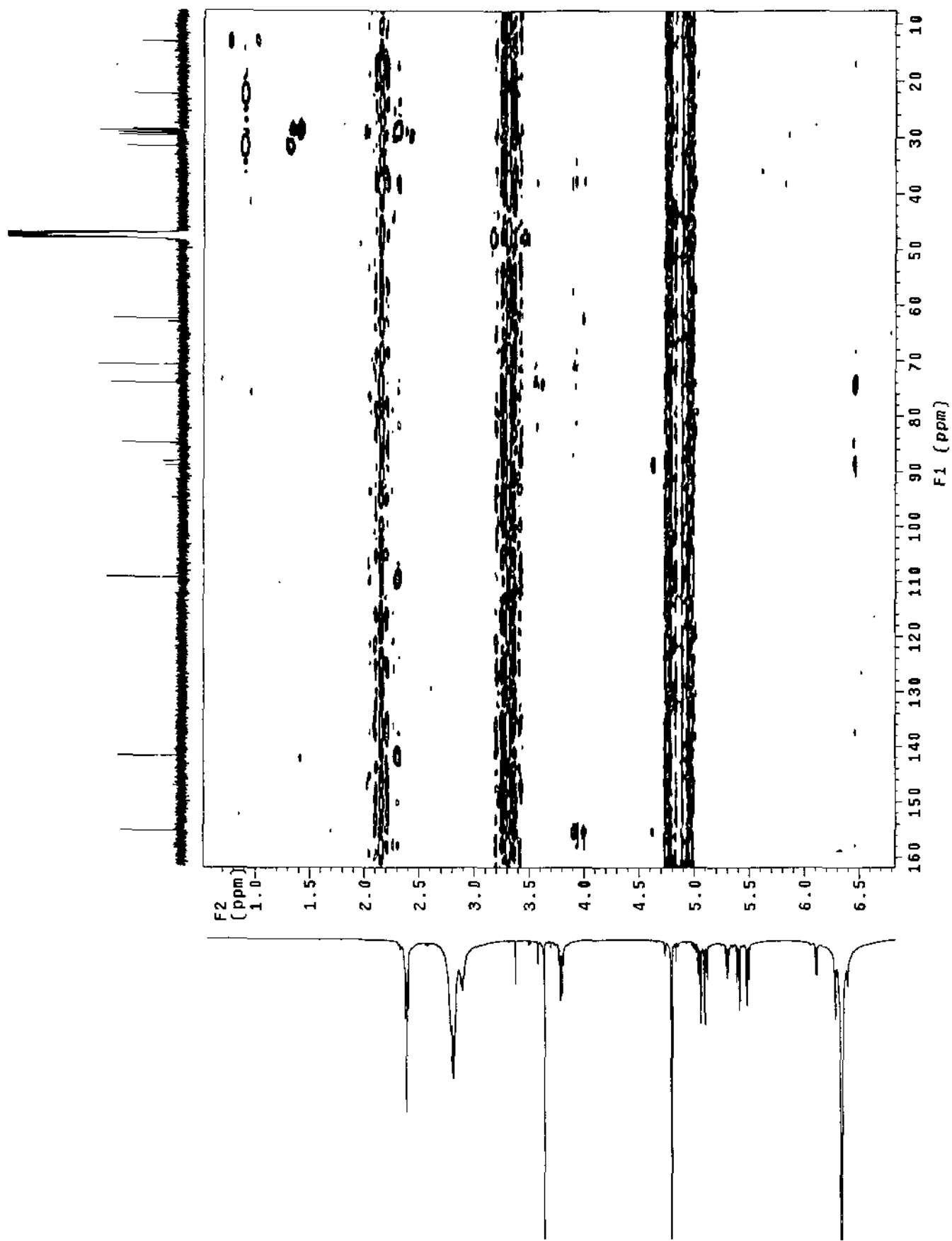


Fig. 3-29. HMBC spectrum of raspailyne B1(95B-8-E).

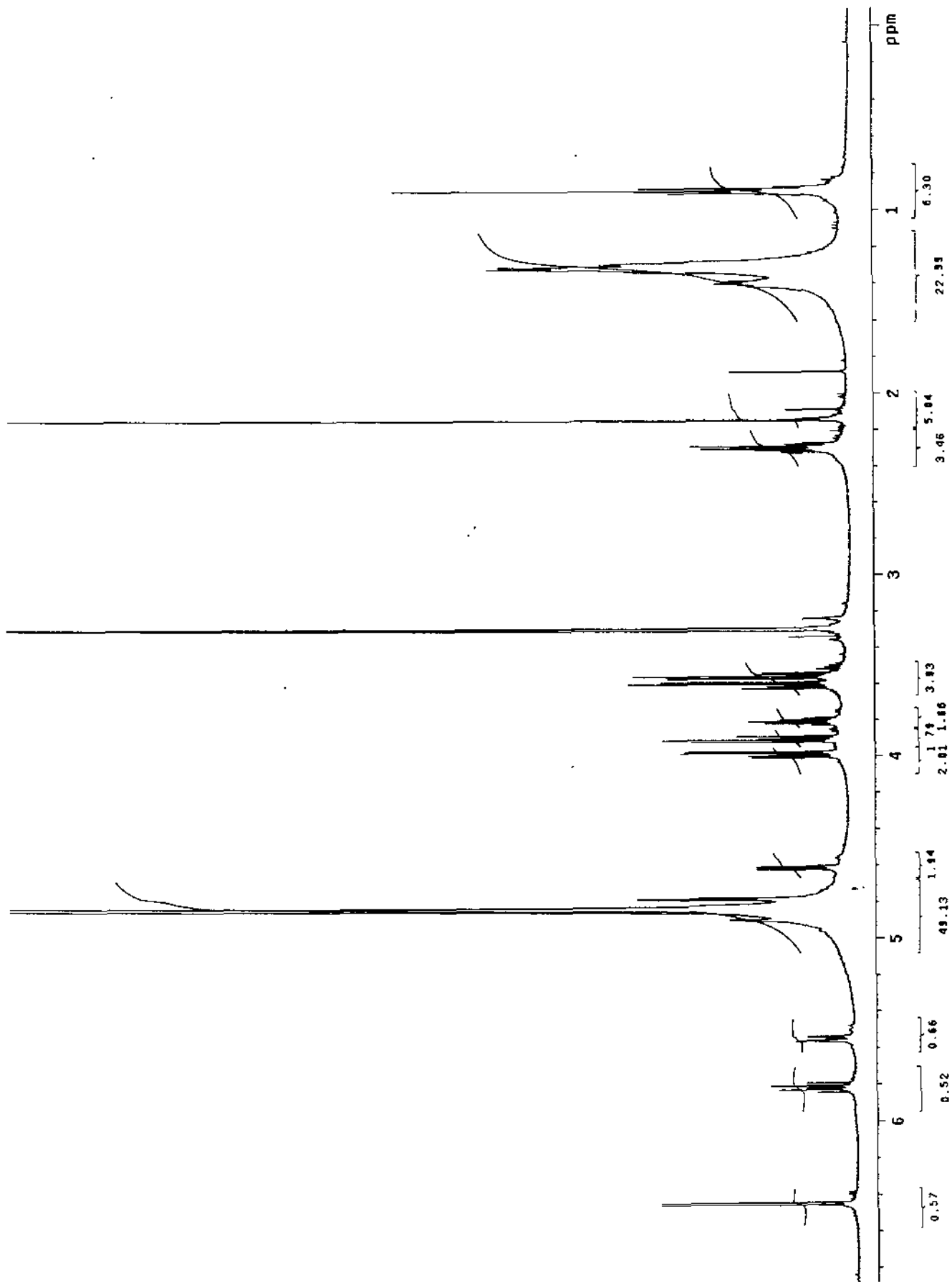


Fig. 3-30. Proton NMR spectrum of raspailyne B2(95B-8-D).

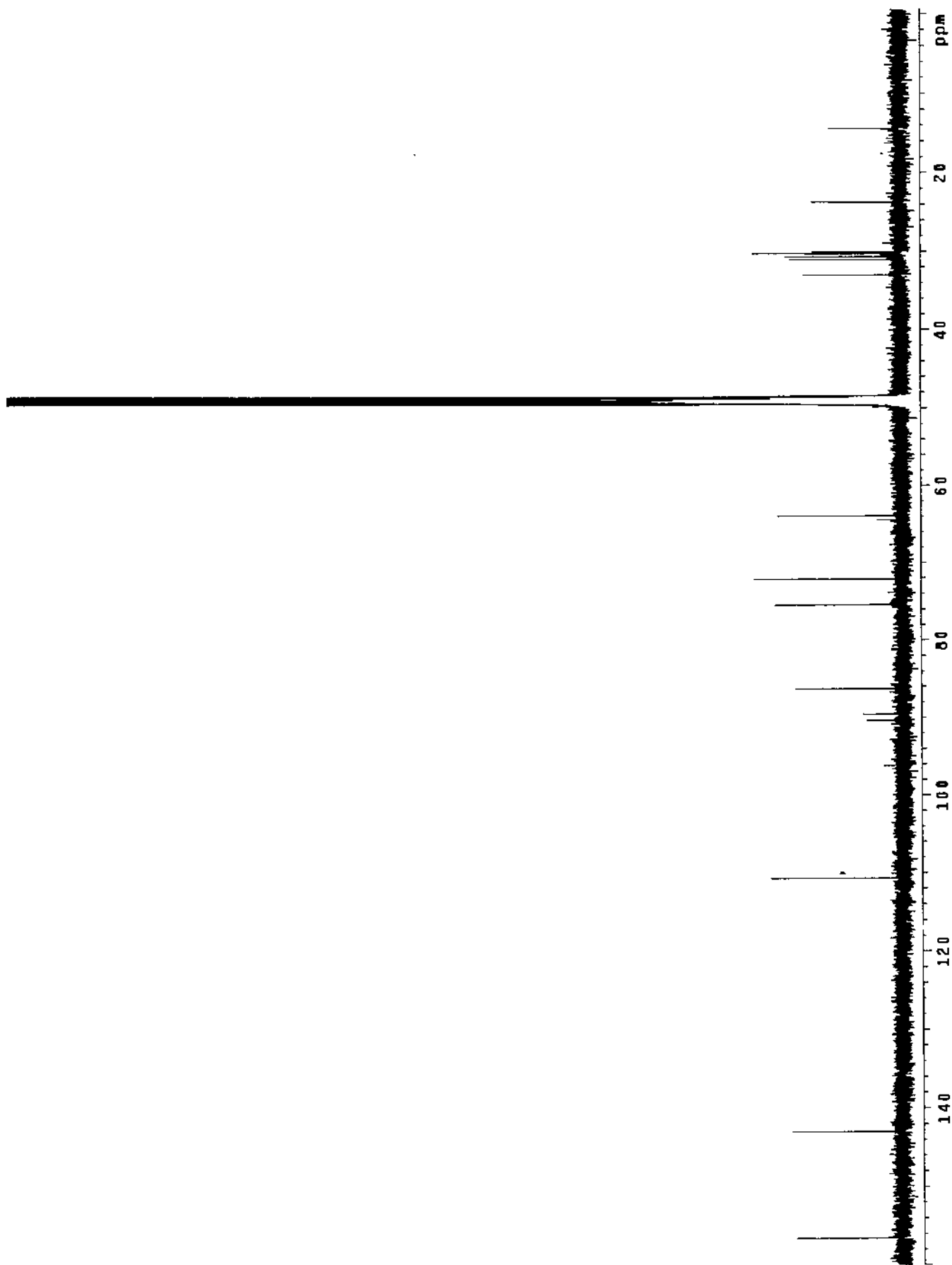


Fig. 3-31. Carbon NMR spectrum of raspailyne B2(95B-8-D).

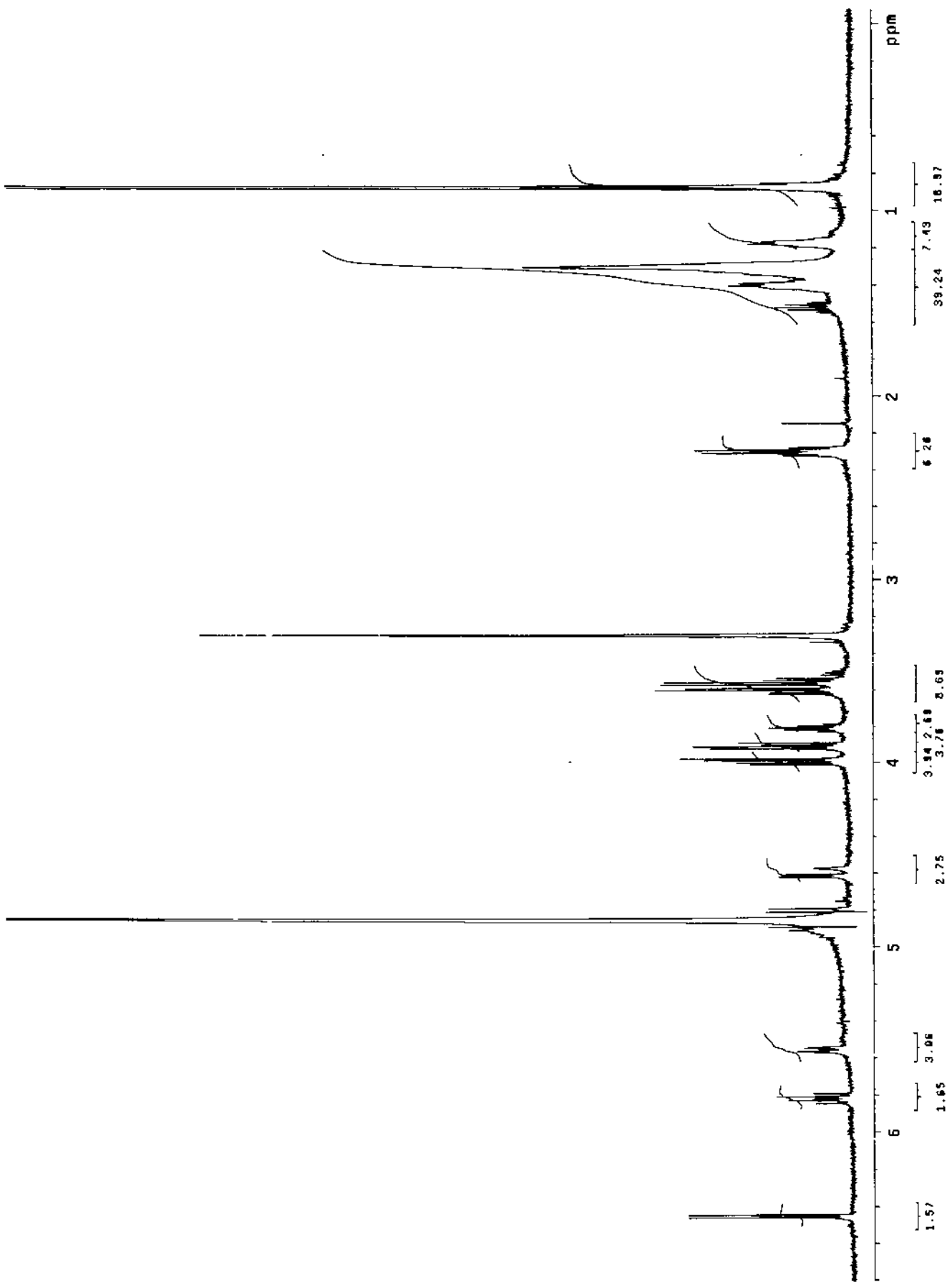


Fig. 3-32. Proton NMR spectrum of isoraspailyne B(95B-8-F).

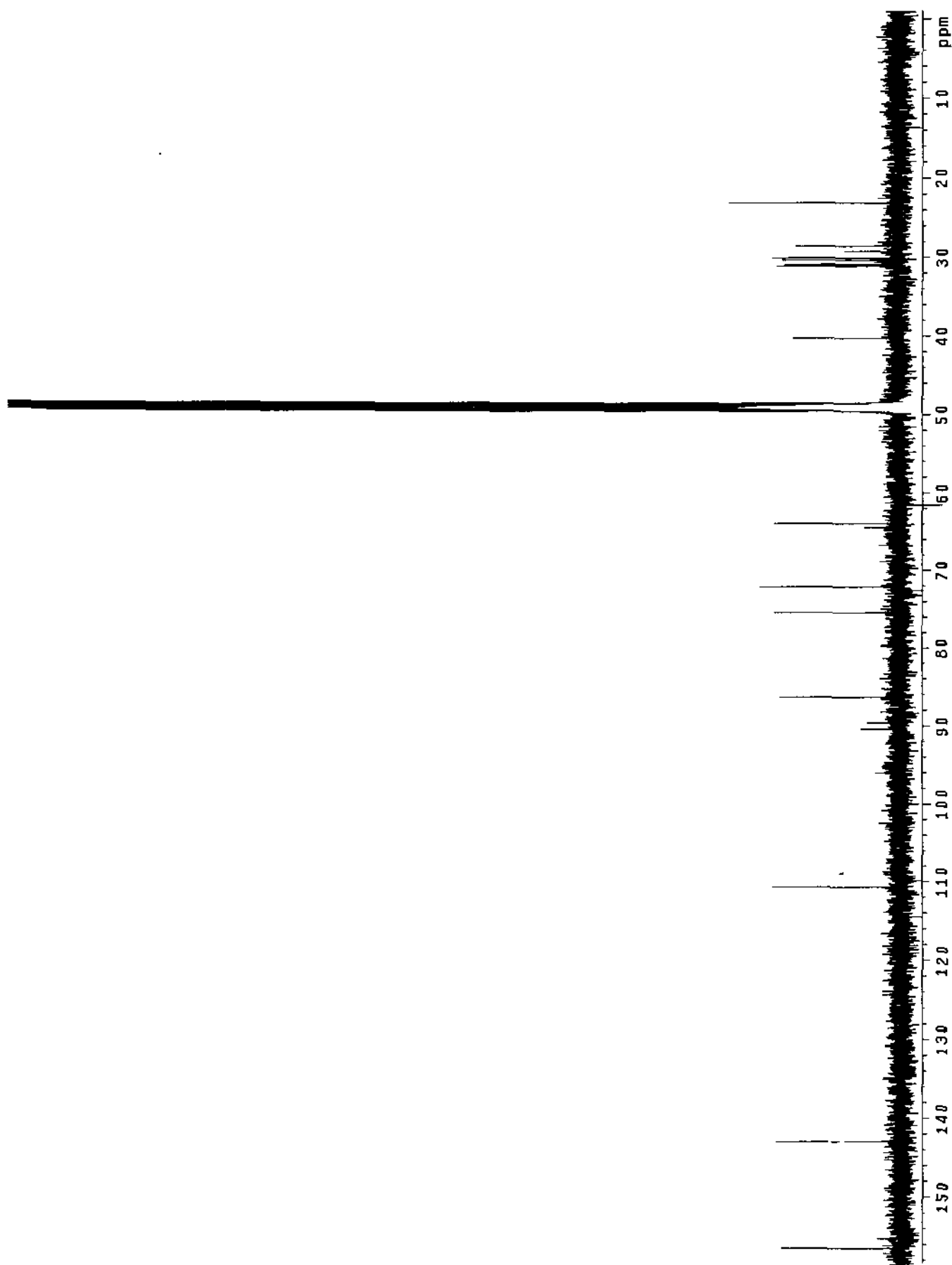


Fig. 3-33. Carbon NMR spectrum of isoraspaillyne B(95B-8-F).

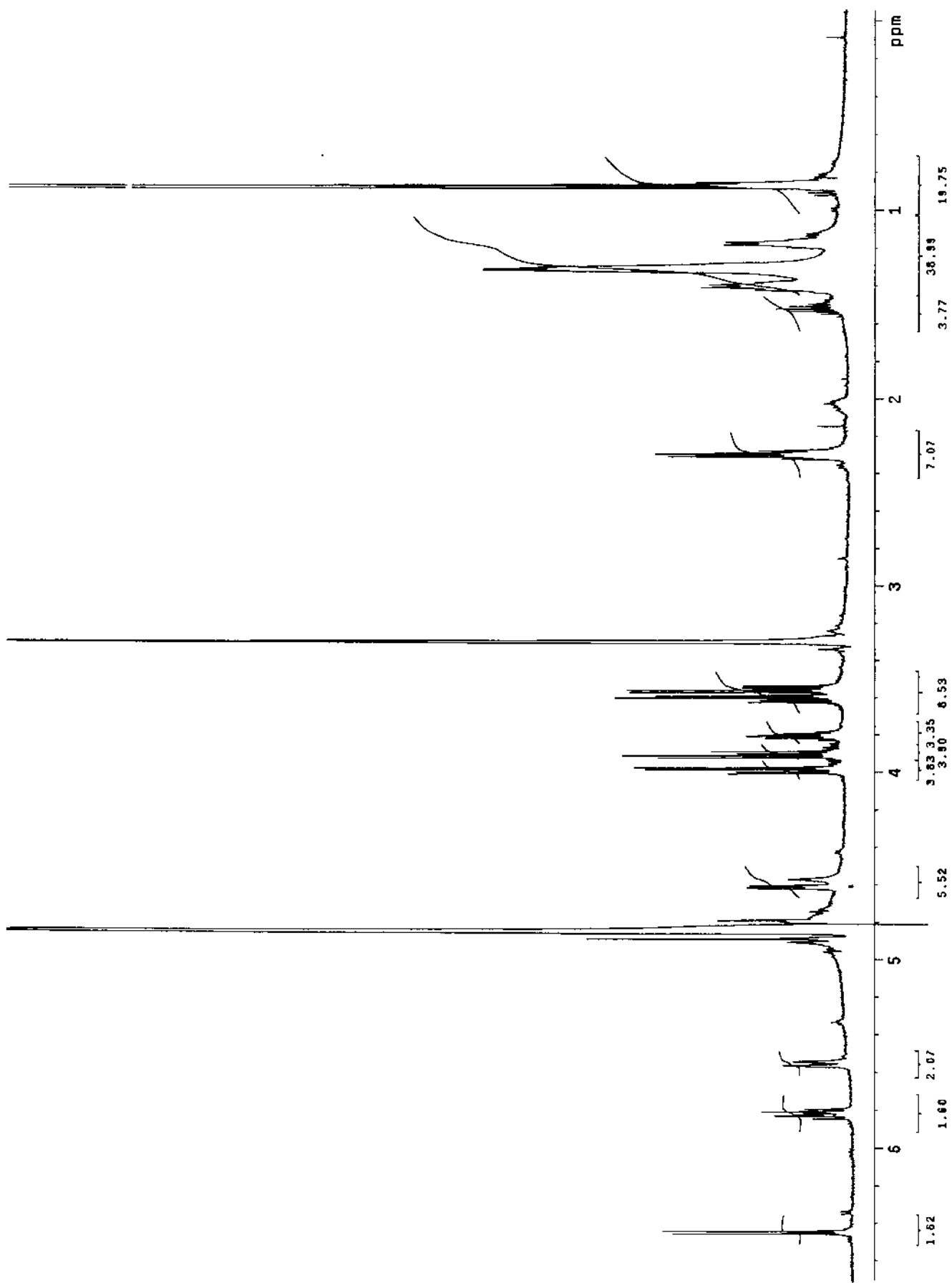


Fig. 3-34. Proton NMR spectrum of isoraspaillyne B1(95B-8-U).

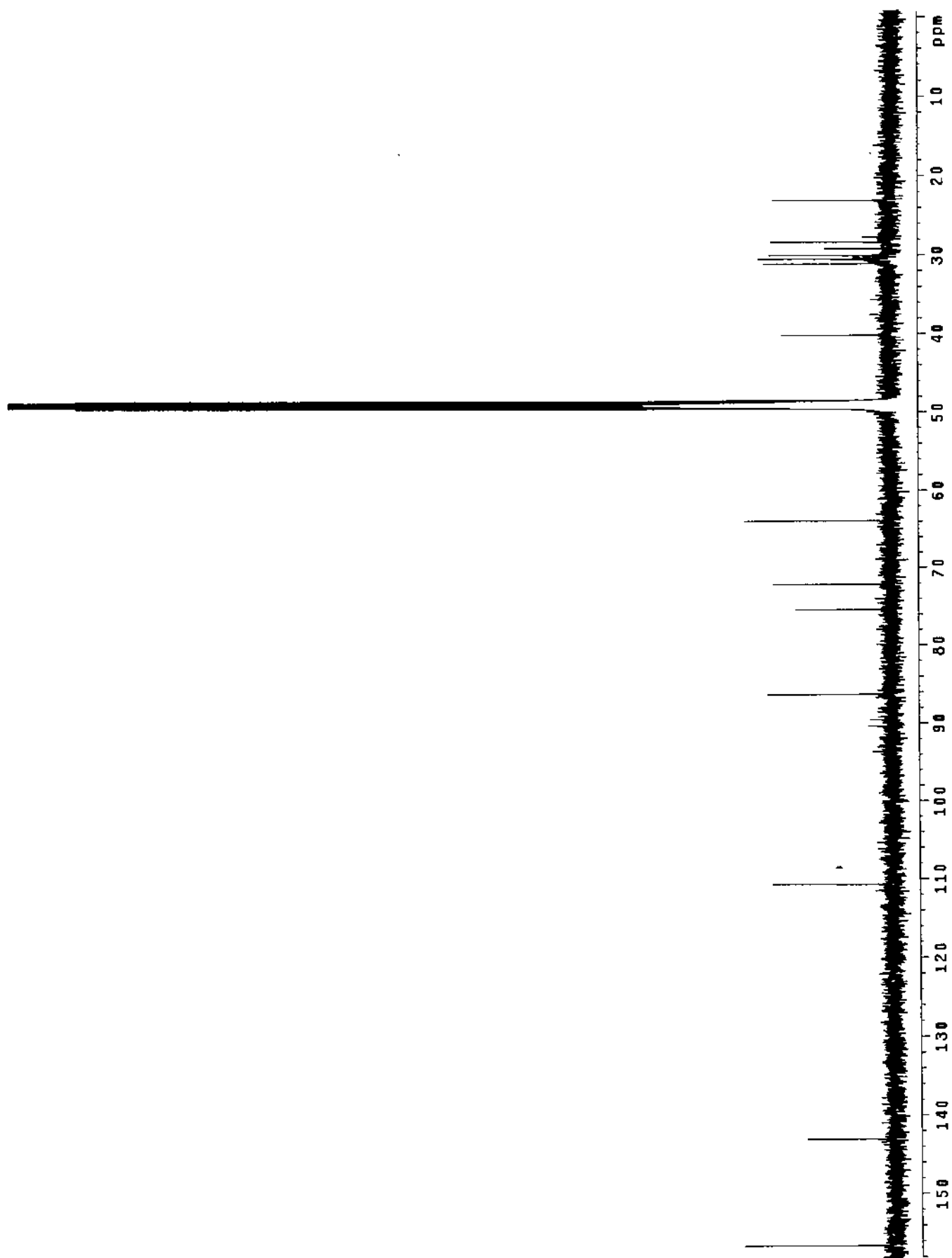


Fig. 3-35. Carbon NMR spectrum of isoraspaillyne B1(95B-8-U).

[Mass Spectrum]

Data : K980119006

Date : 19-Jan-98 21:26

Sample: -GORDI:SYH_95B-8-C

Note : -in MeOH with NBA(Na sat.)

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.04 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.4 deg.C

BP : m/z 274.8532

Int. : 903.48

Output m/z range : 50.0000 to 399.8515

Cut Level : 0.00 %

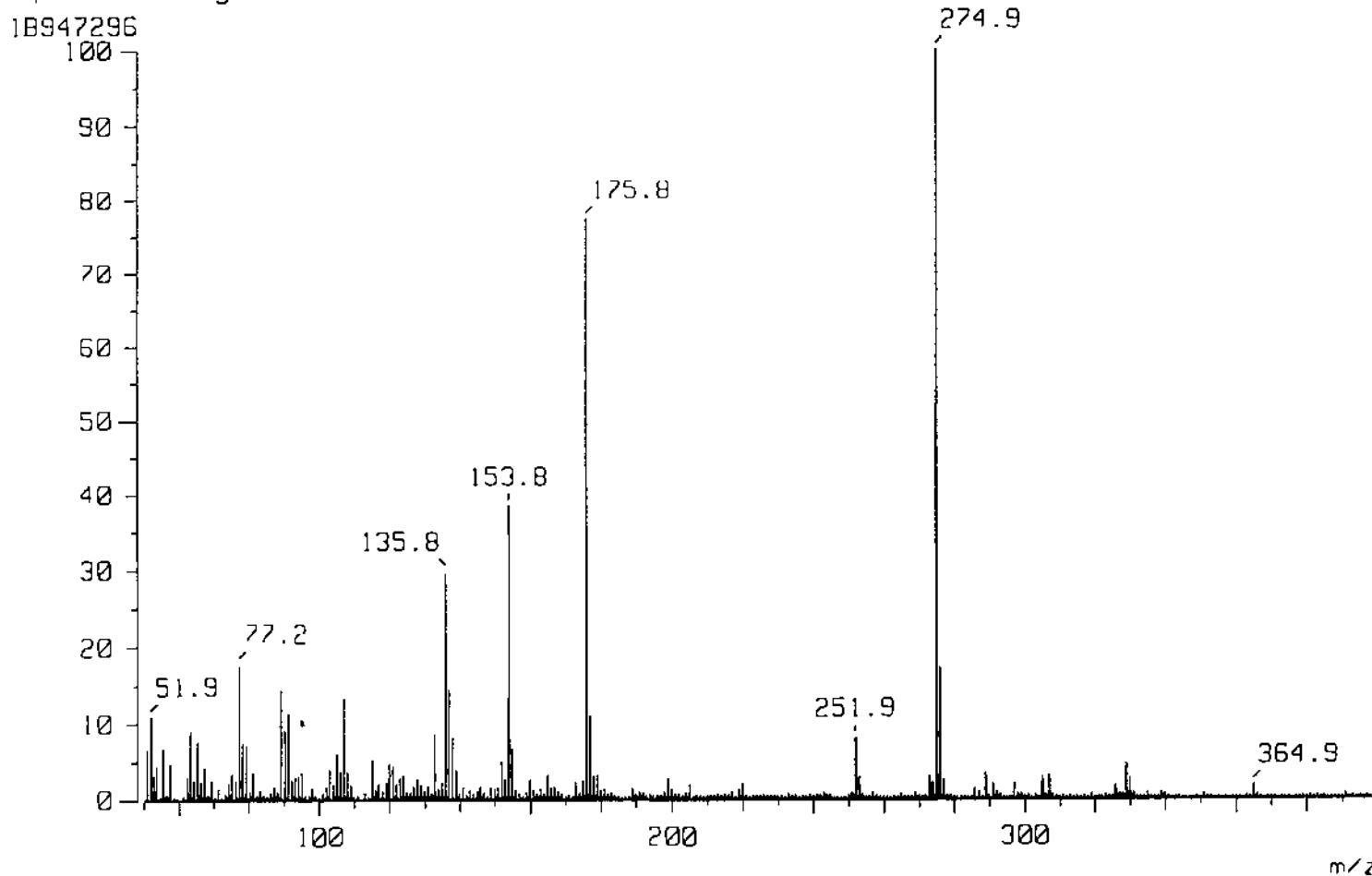


Fig. 3-36. HRMS spectrum of petroraspaillyne A1 (95B-8-C).

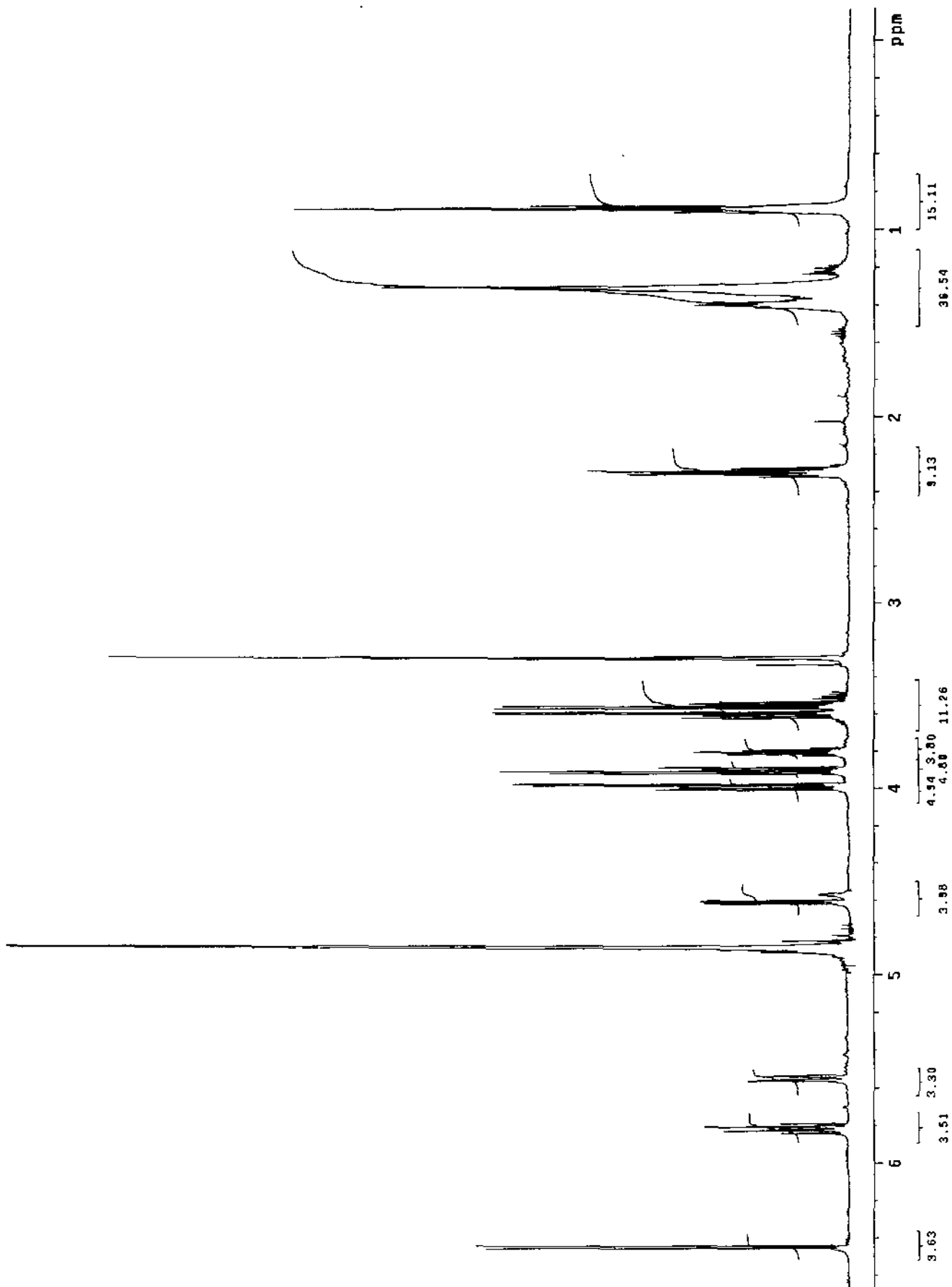


Fig. 3-37. Proton NMR spectrum of petroraspailyne A1(95B-8-C).

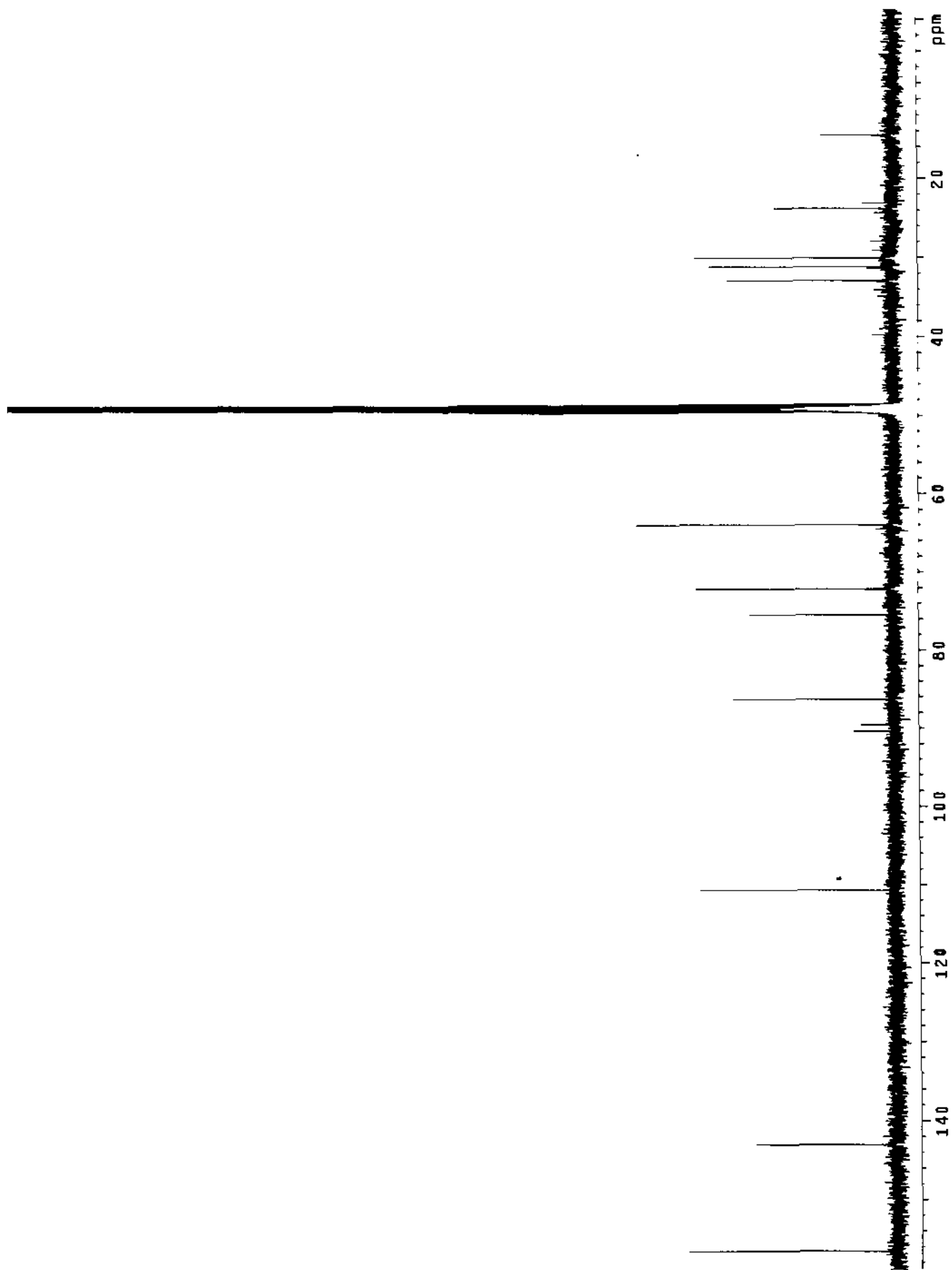


Fig. 3-38. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A1(95B-8-C).

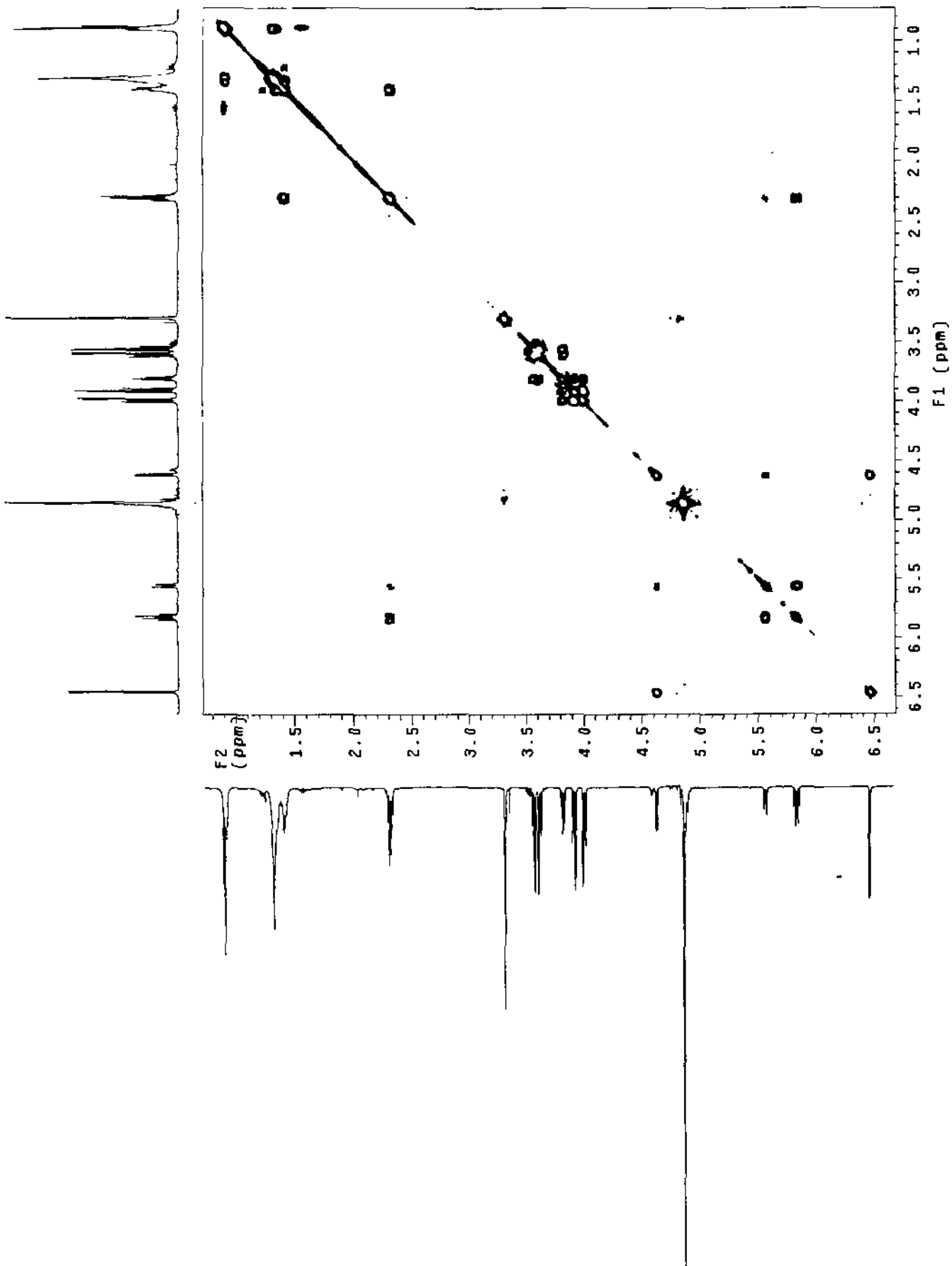


Fig. 3-39. Proton COSY spectrum of petroraspailyne A1(95B-8-C).

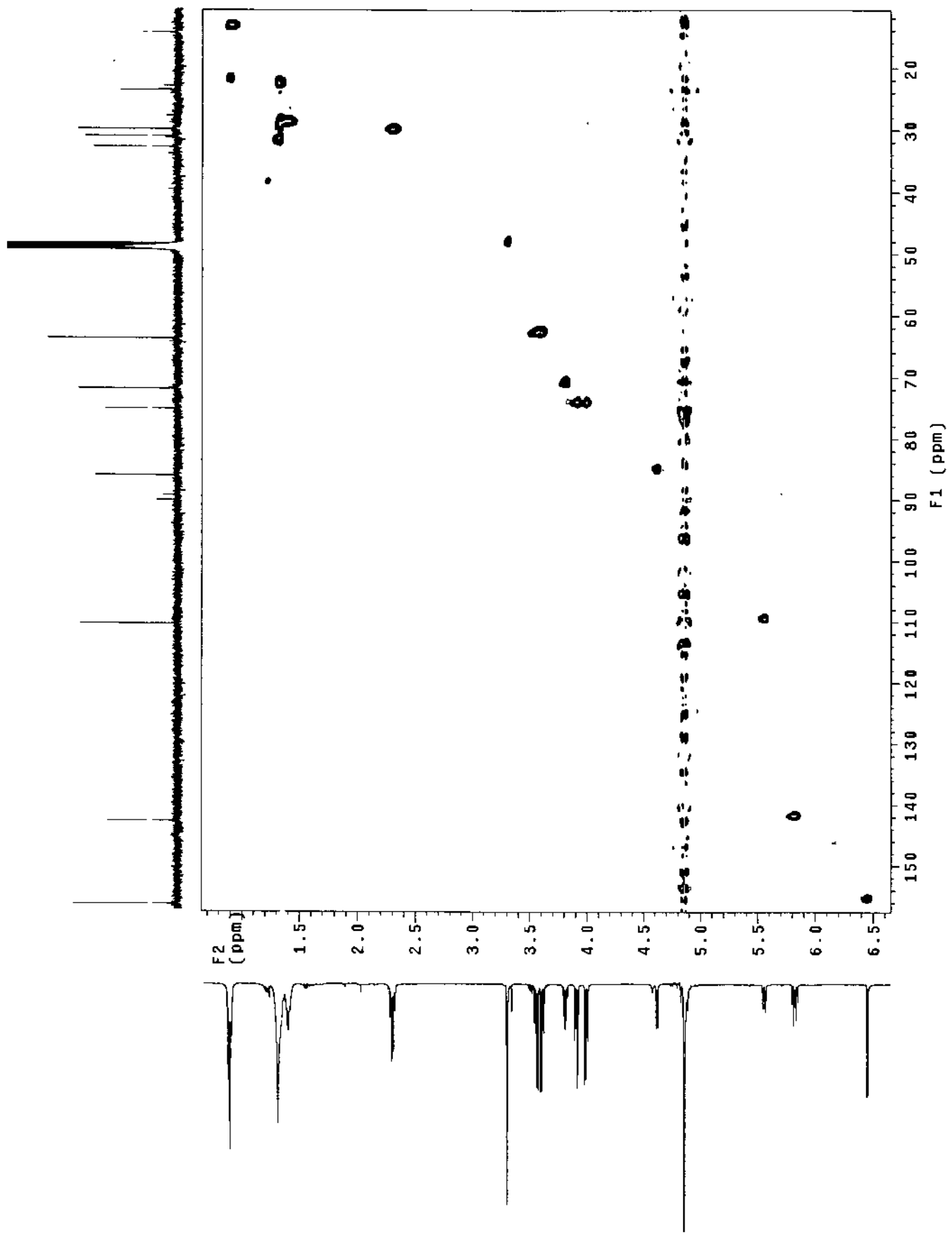


Fig. 3-40. HMQC spectrum of petroraspailyne A1(95B-8-C).

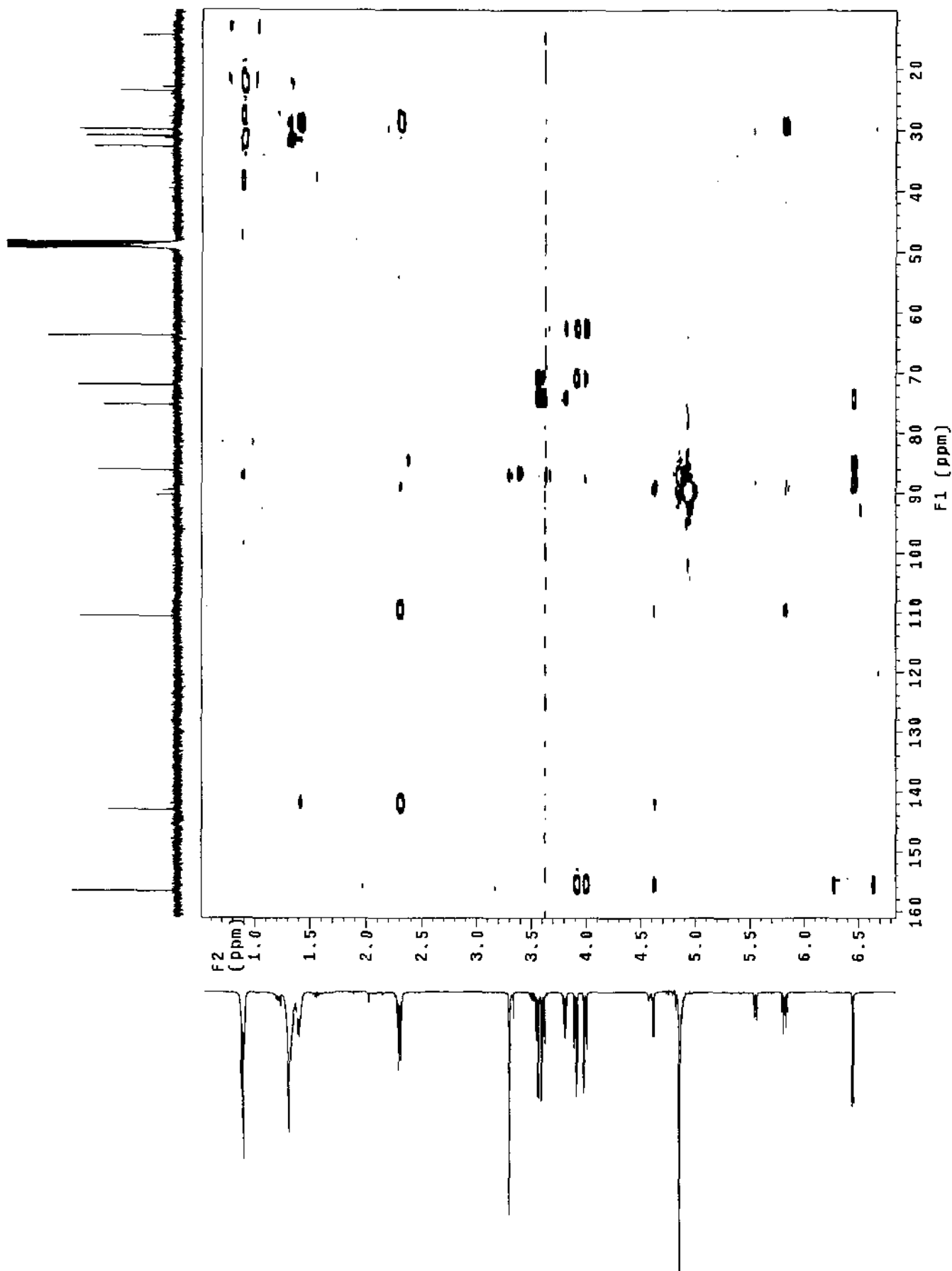


Fig. 3-41. HMBC spectrum of petroraspailyne A1(95B-8-C).

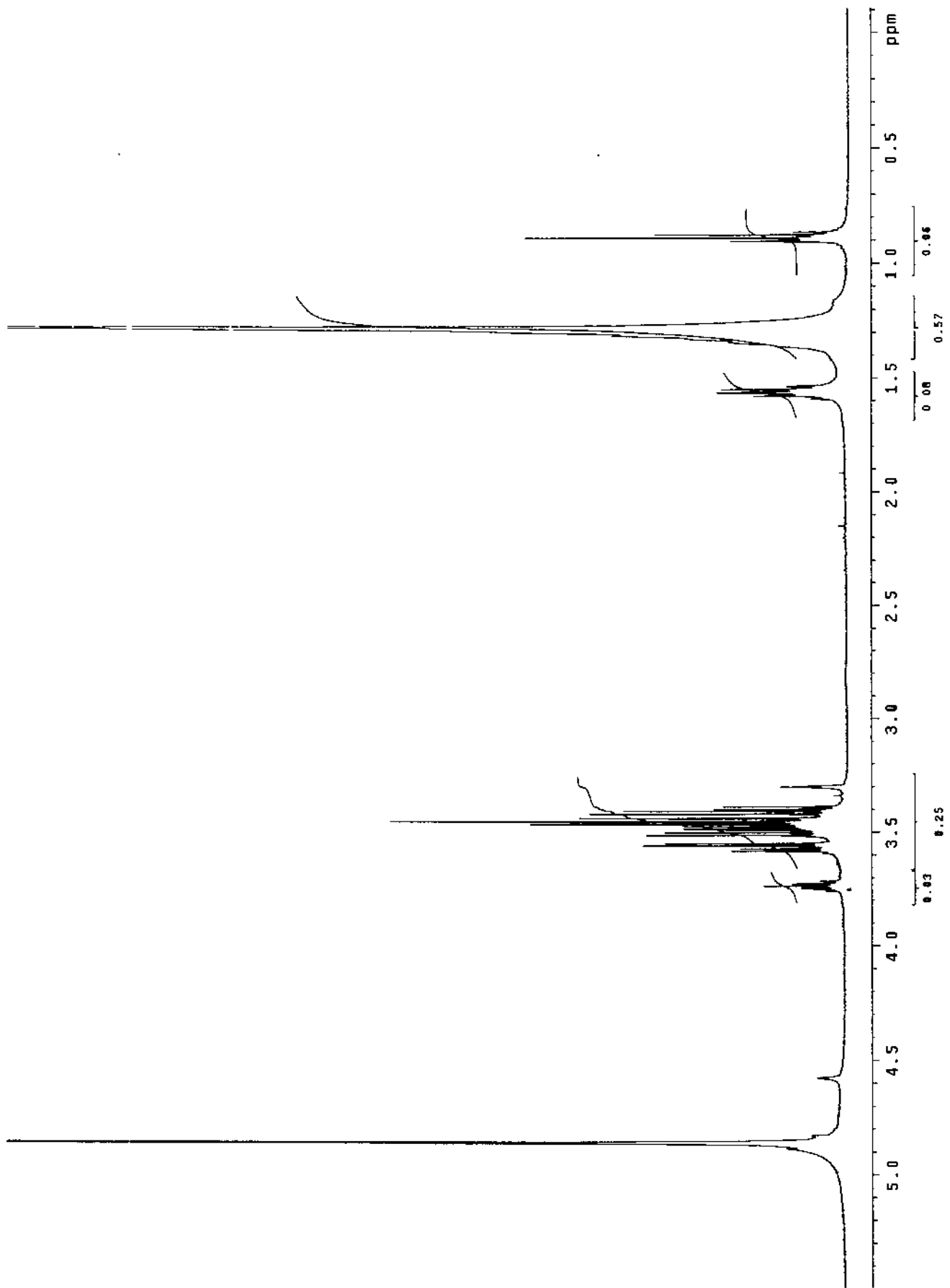


Fig. 3-42. Proton NMR spectrum of perhydropetroraspailyne Al.

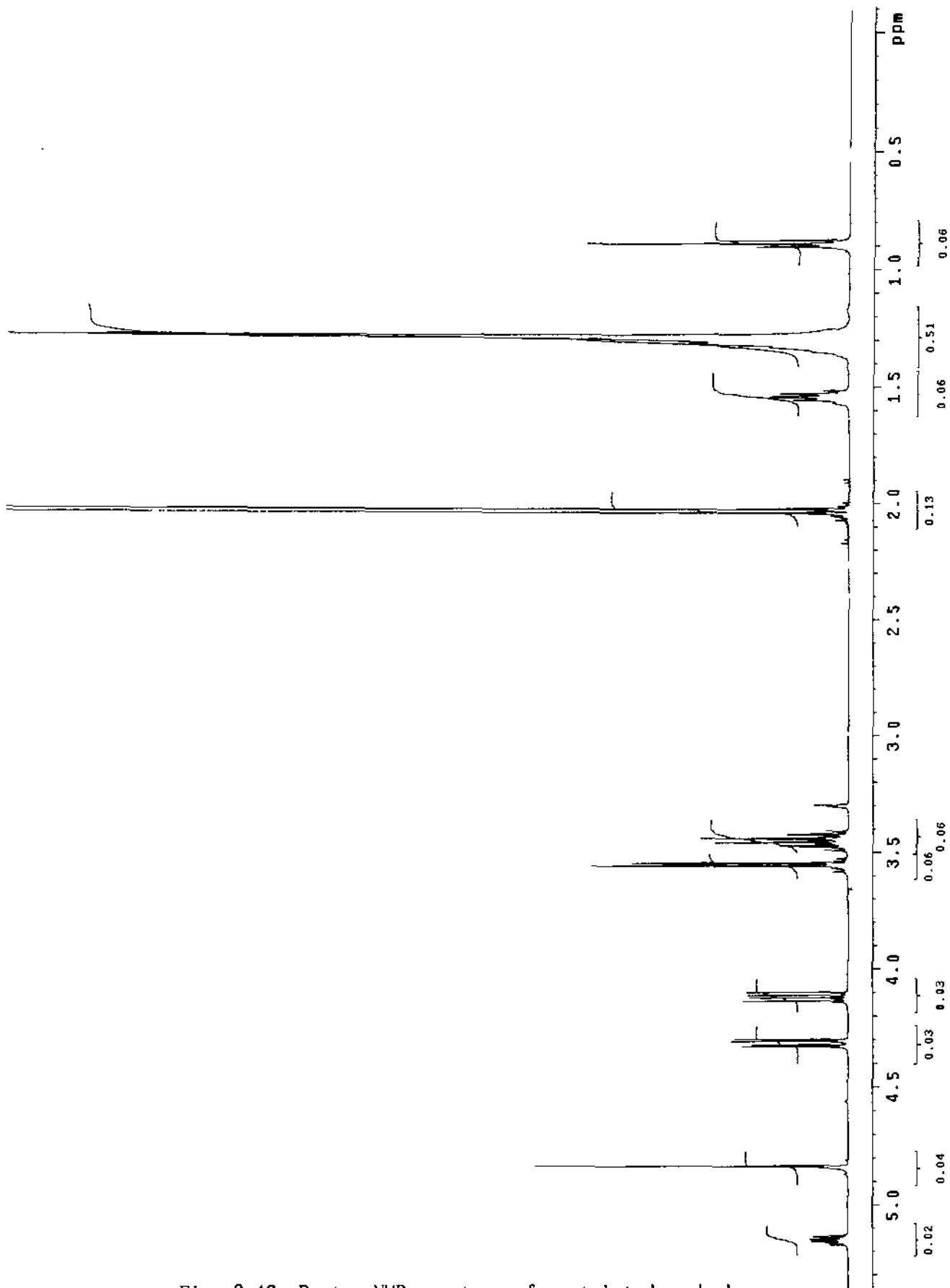


Fig. 3-43. Proton NMR spectrum of acetylated perhydropetroraspaillyne A1.

[Mass Spectrum]

Data : J980209006

Date : 09-Feb-98 14:20

Sample: -H.Y.Institute:SYW_95B-8-L

Note : -in MeOH with NBA

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.06 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.5 deg.C

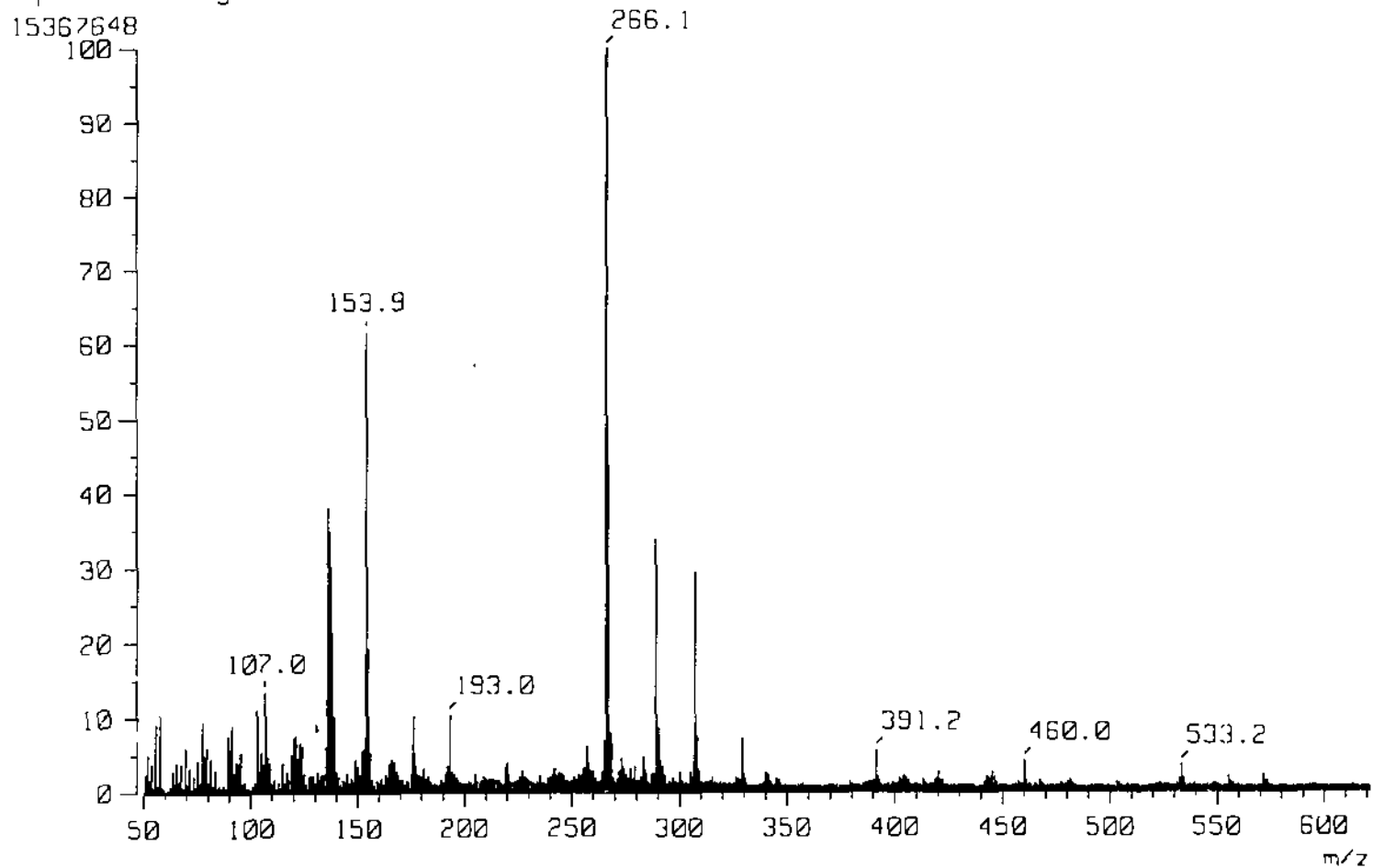
BP : m/z 266.0756

Int. : 732.79

Output m/z range : 50.0000 to 621.2166

Cut Level : 0.00 %

Fig. 3-44. HRMS spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L).



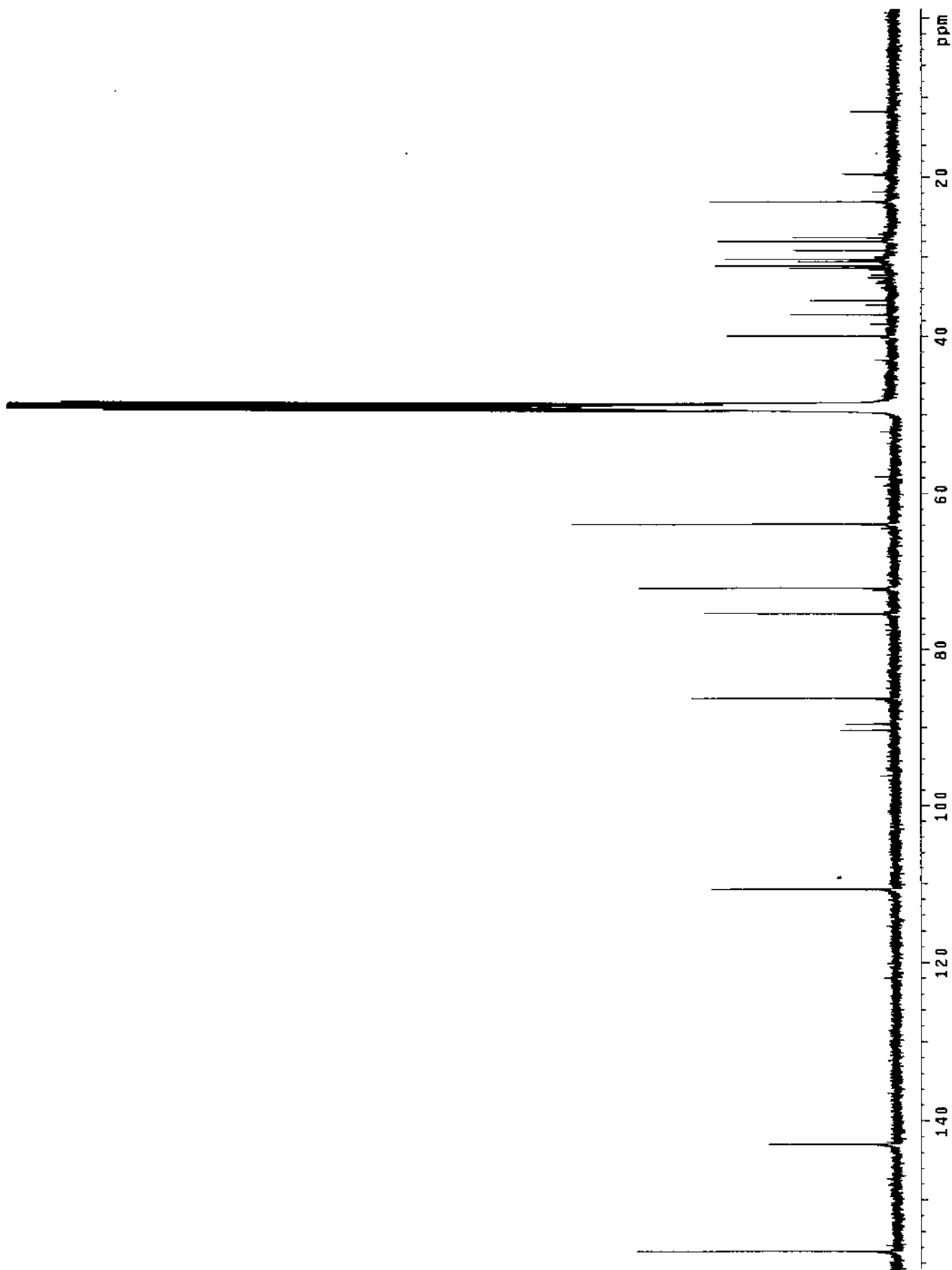


Fig. 3-45. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L).

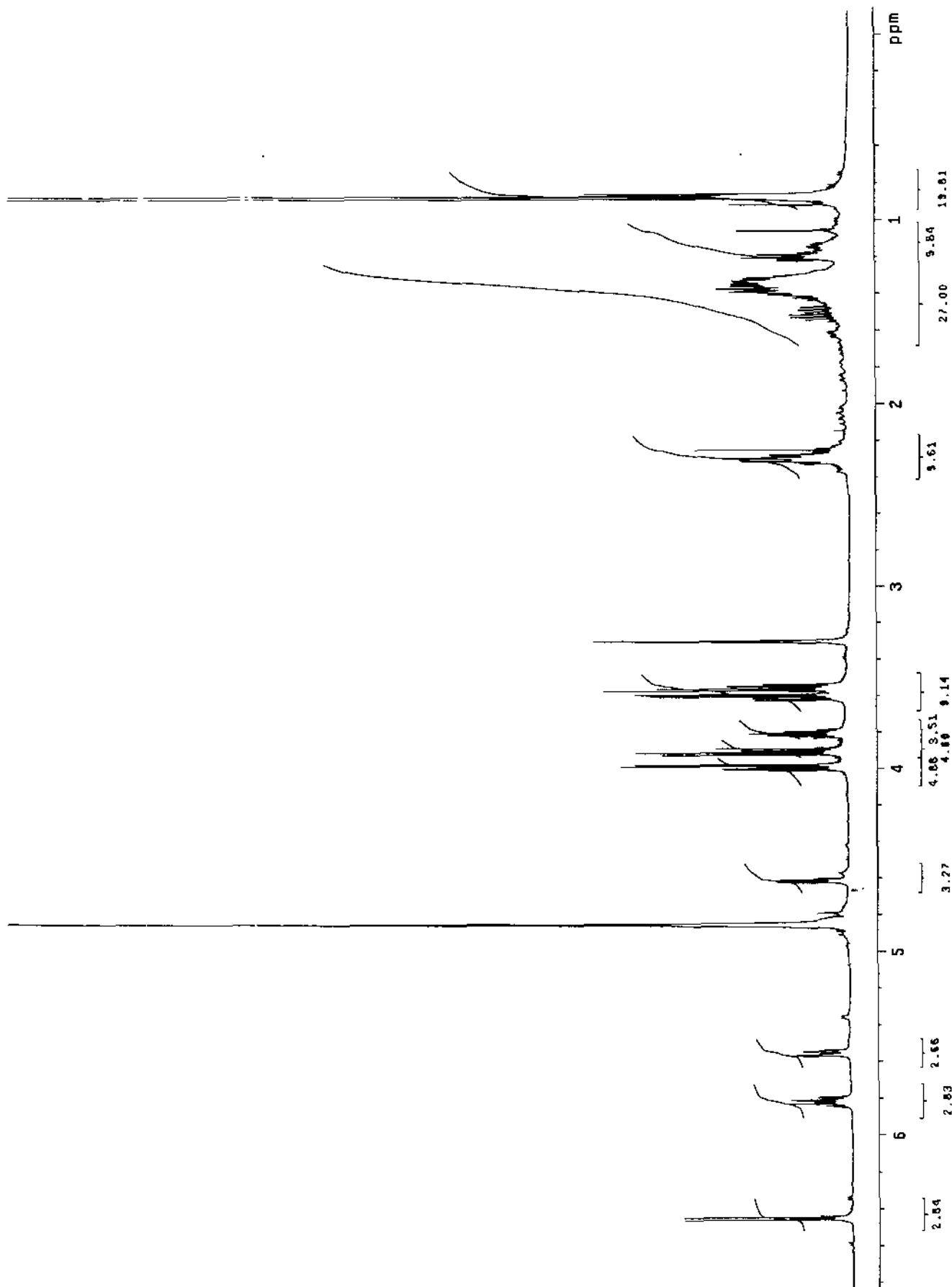


Fig. 3-46. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne A2(95B-8-L).

[Mass Spectrum]

Data : K980119009

Date : 19-Jan-98 21:43

Sample: -GORDI:SYH_95B-8-K

Note : -in MeOH with NBA(Na sat.)

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.04 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.3 deg.C

BP : m/z 316.9041

Int. : 1441.76

Output m/z range : 50.0000 to 369.1395

Cut Level : 0.00 %

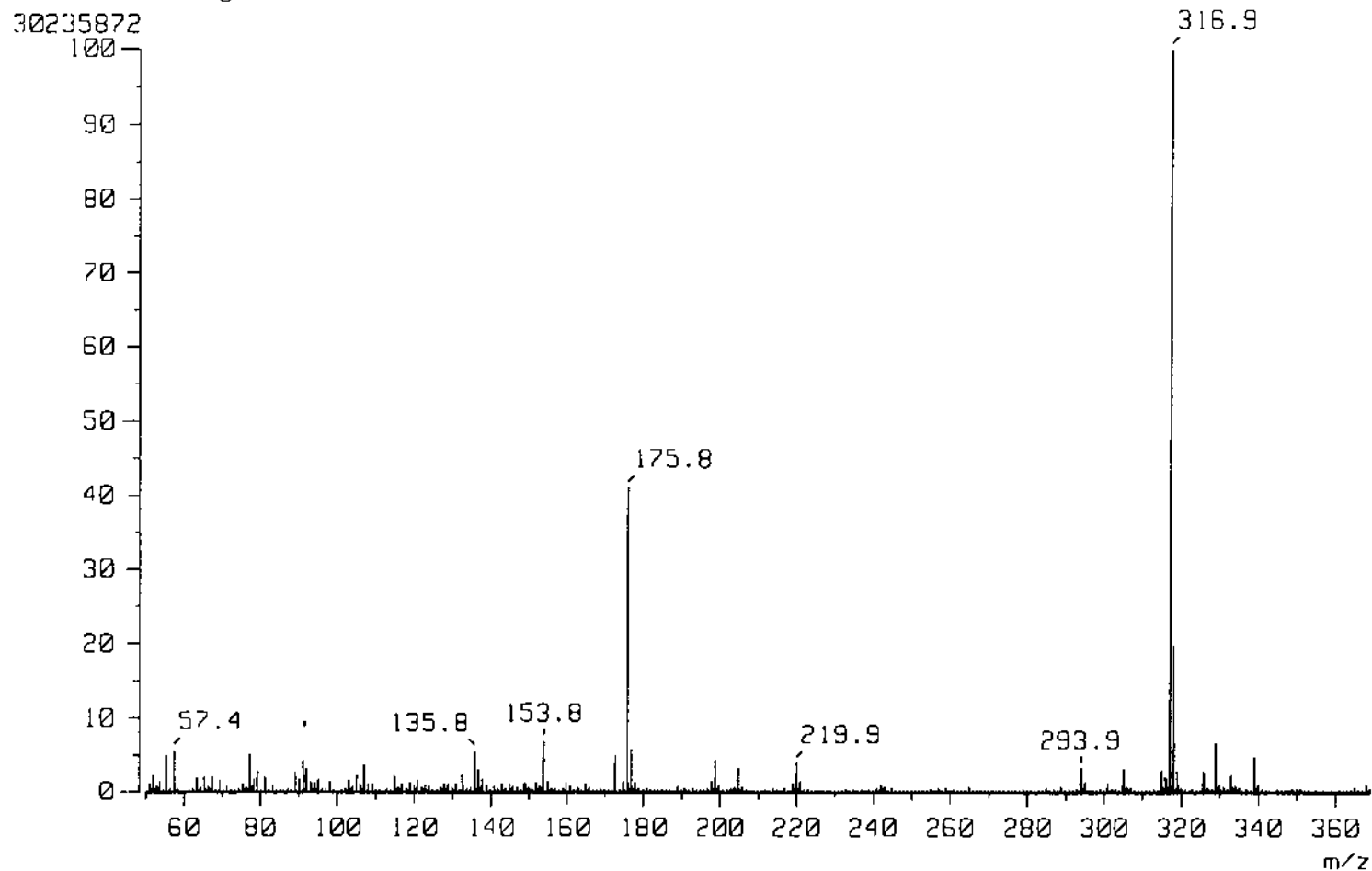


Fig. 3-47. HRMS spectrum of petroraspai lyne A3(95B-8-K).

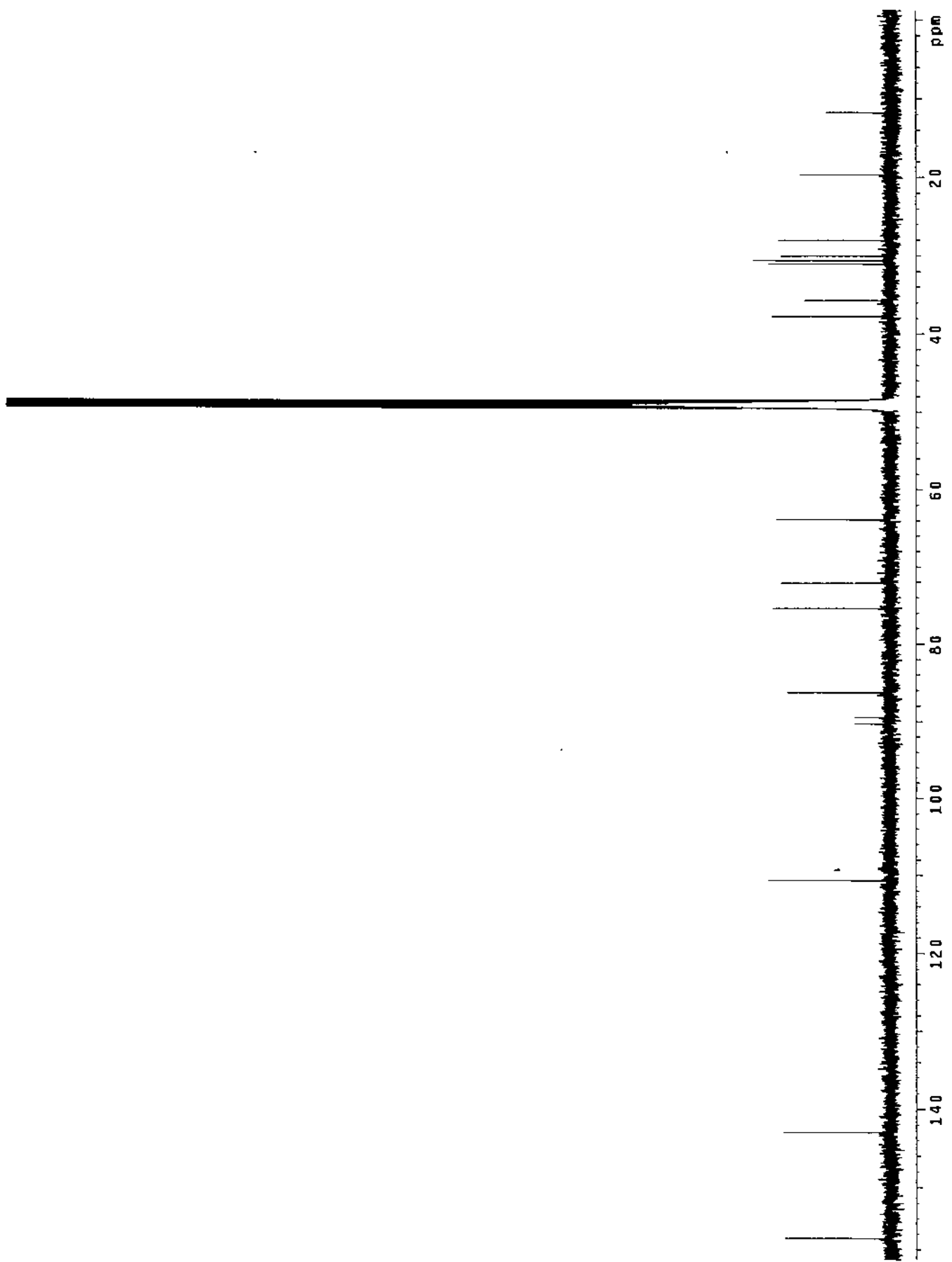


Fig. 3-48. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne A3(95B-8-K).

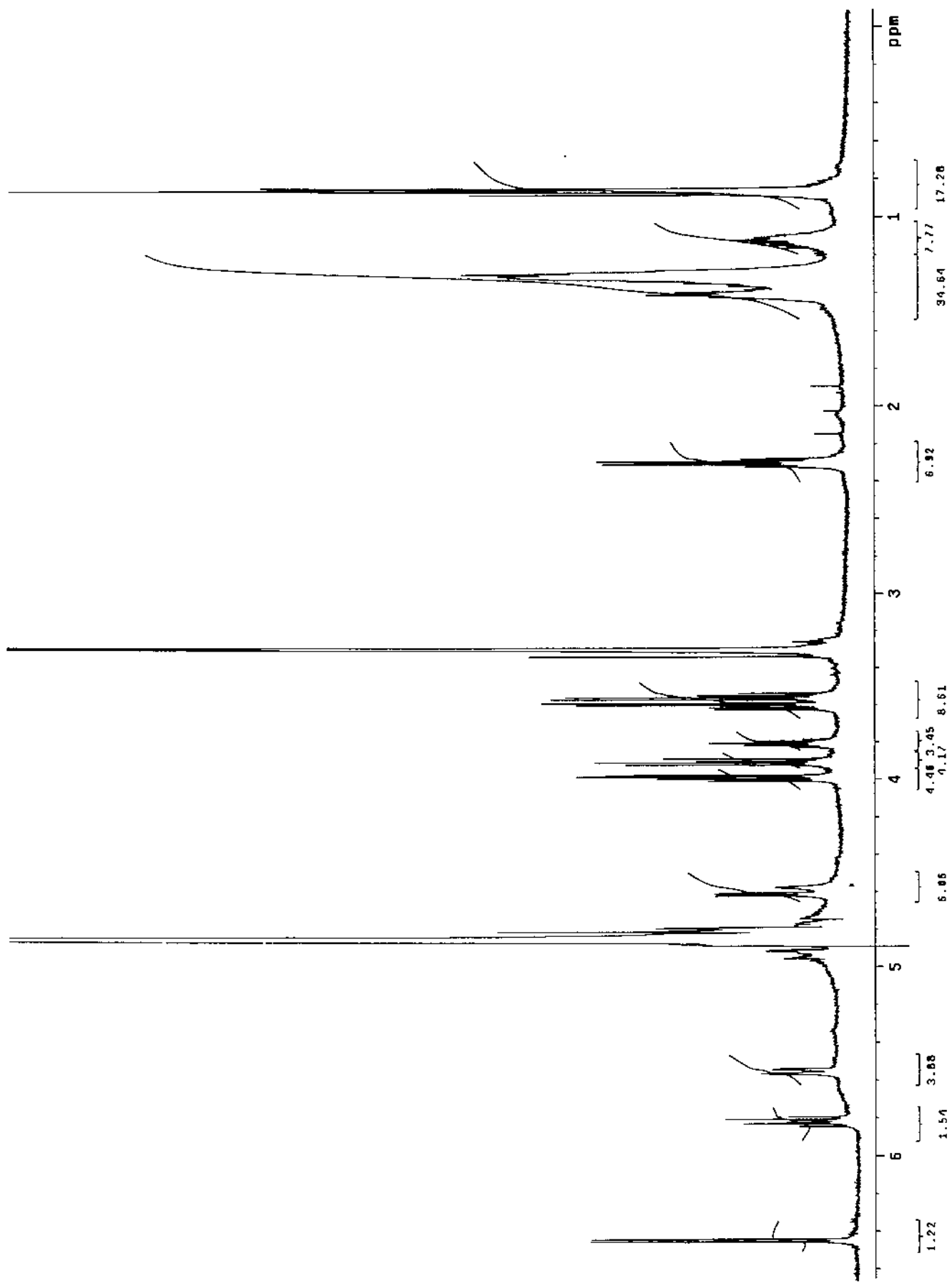


Fig. 3-49. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne A3(95B-8-K).

[Mass Spectrum]

Data : K980119007

Date : 19-Jan-98 21:32

Sample: -CORDI:SYH 96X-1-S

Note : -in MeOH with NBA(Na sat.)

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)

RT : 0.04 min Scan# : (1,2)

Temp : 0.3 deg.C

BP : m/z 276.8552 Int. : 1233.19

Output m/z range : 50.0000 to 399.0510

Cut Level : 0.00 %

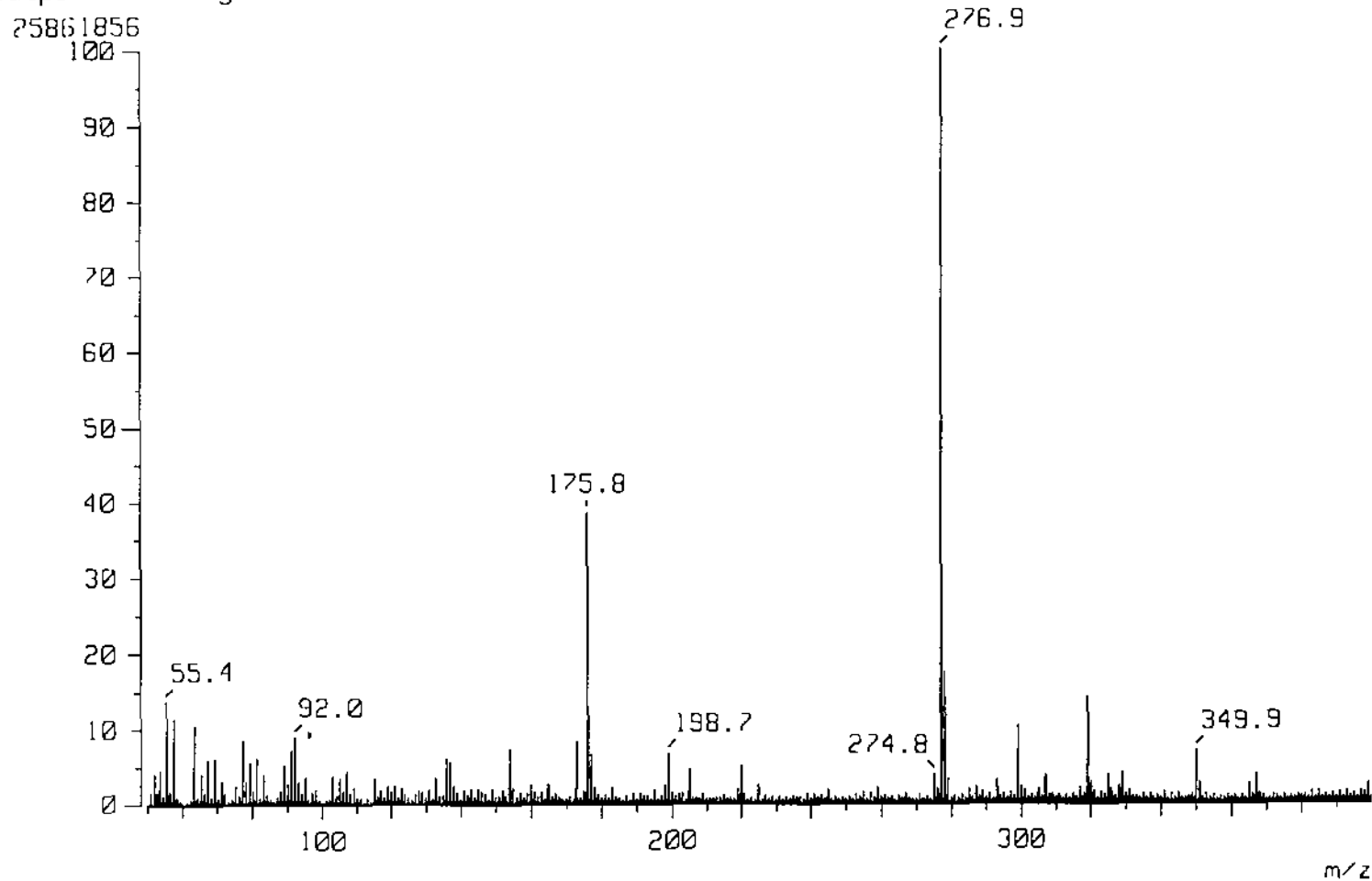


Fig. 3-50. HRMS spectrum of petroraspai lyne B1 (95B-8-S).

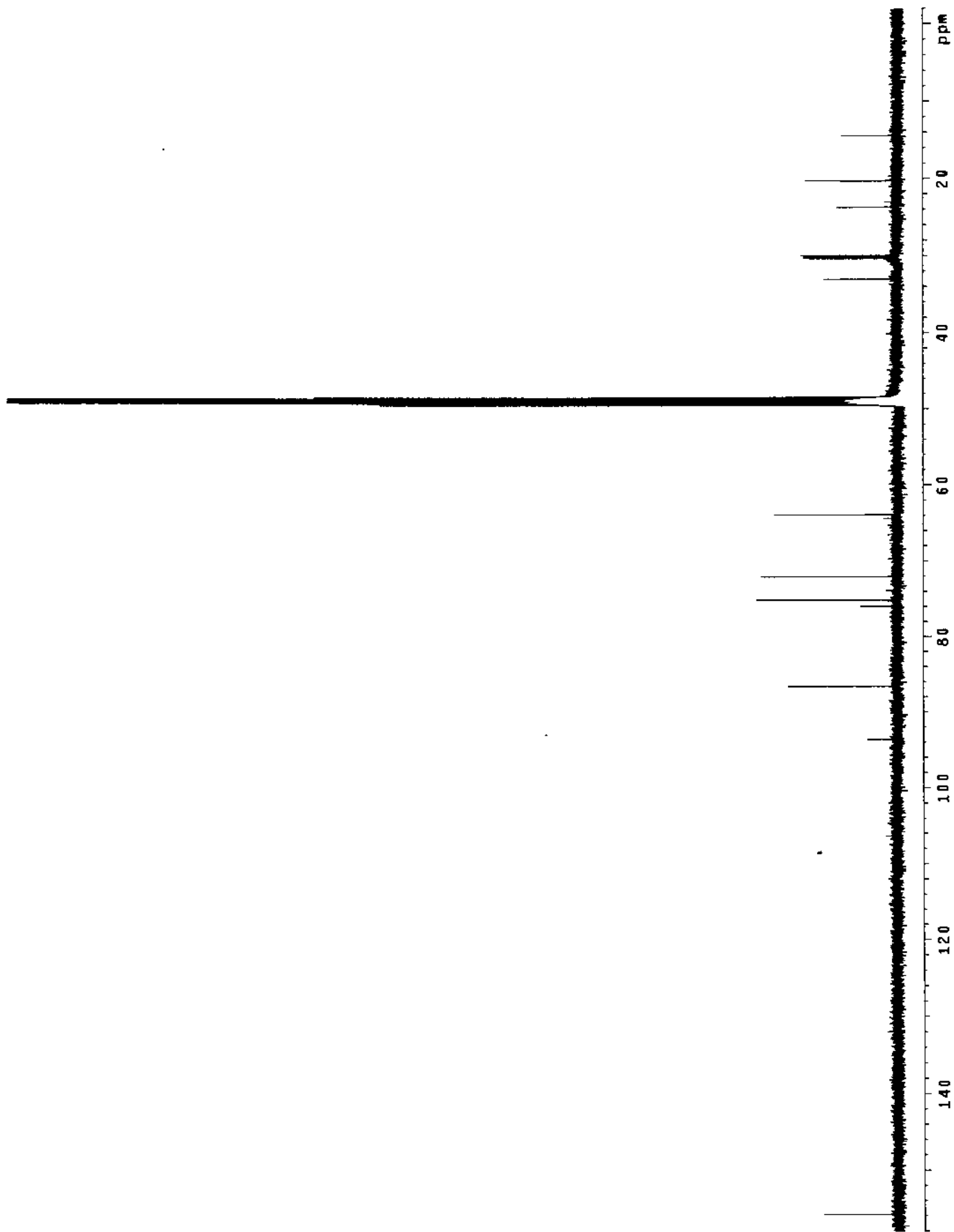


Fig. 3-51. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S).

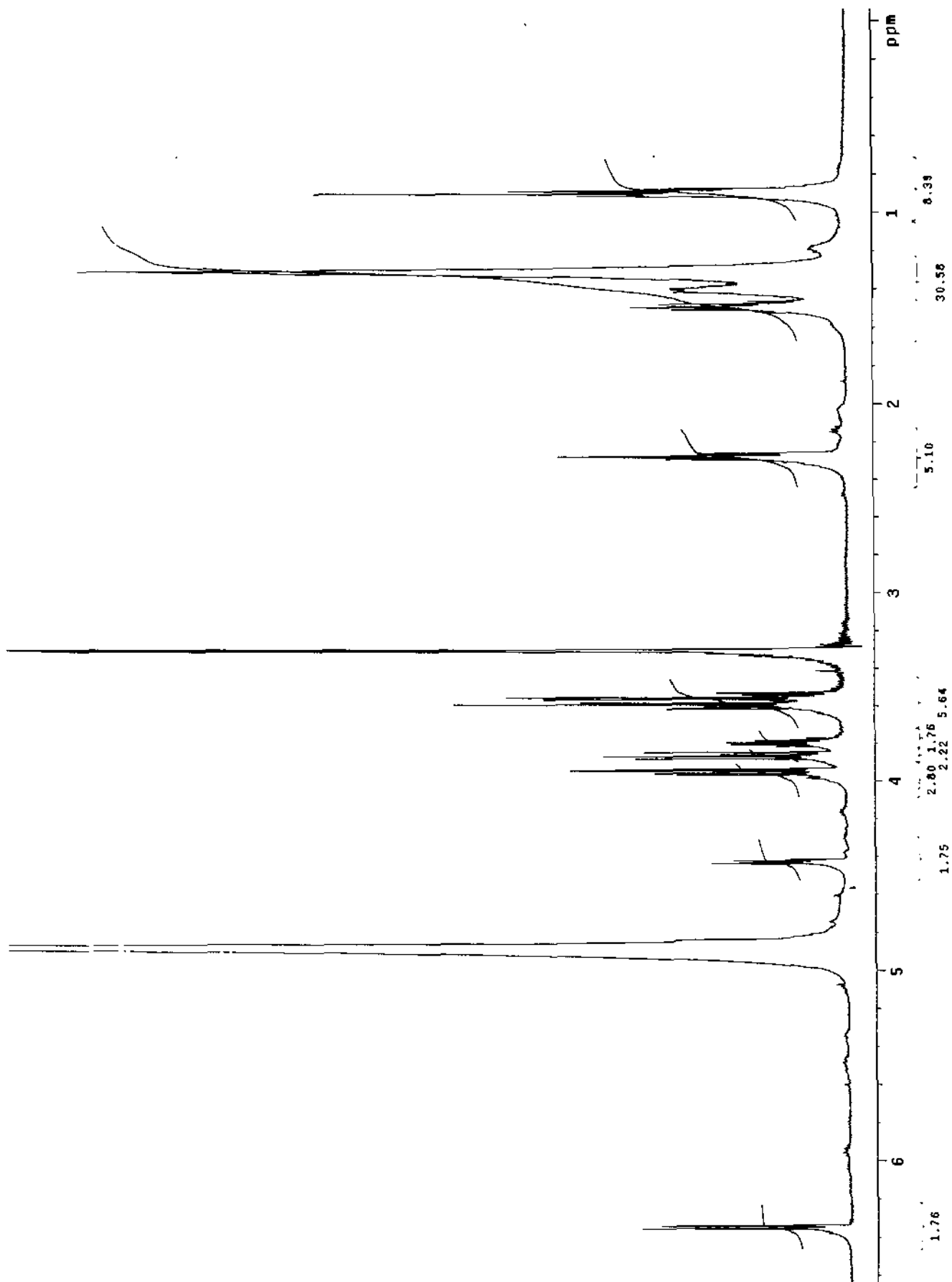


Fig. 3-52. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S).

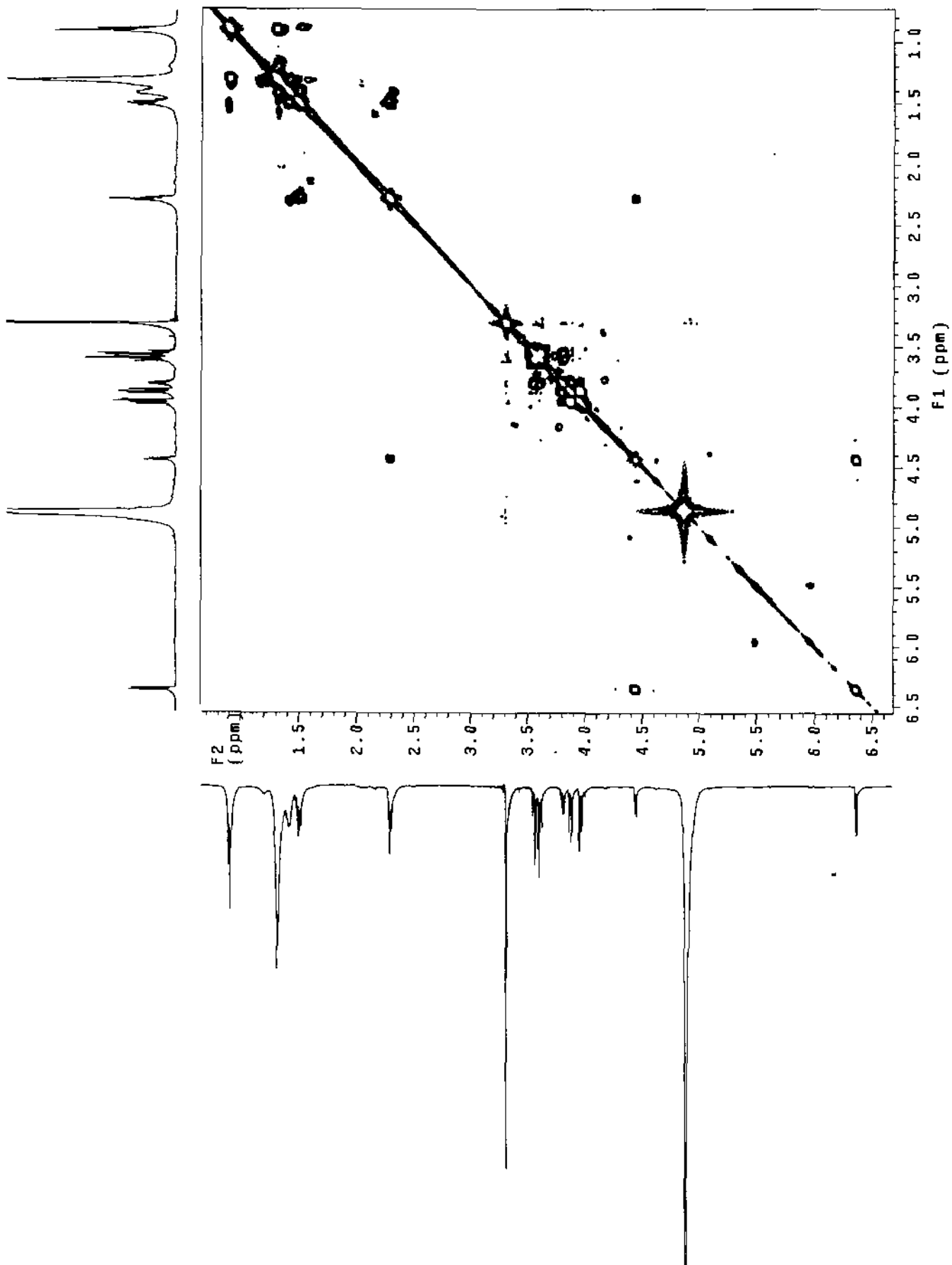


Fig. 3-53. Proton COSY spectrum of petroraspailyne B1(95B-8-S).

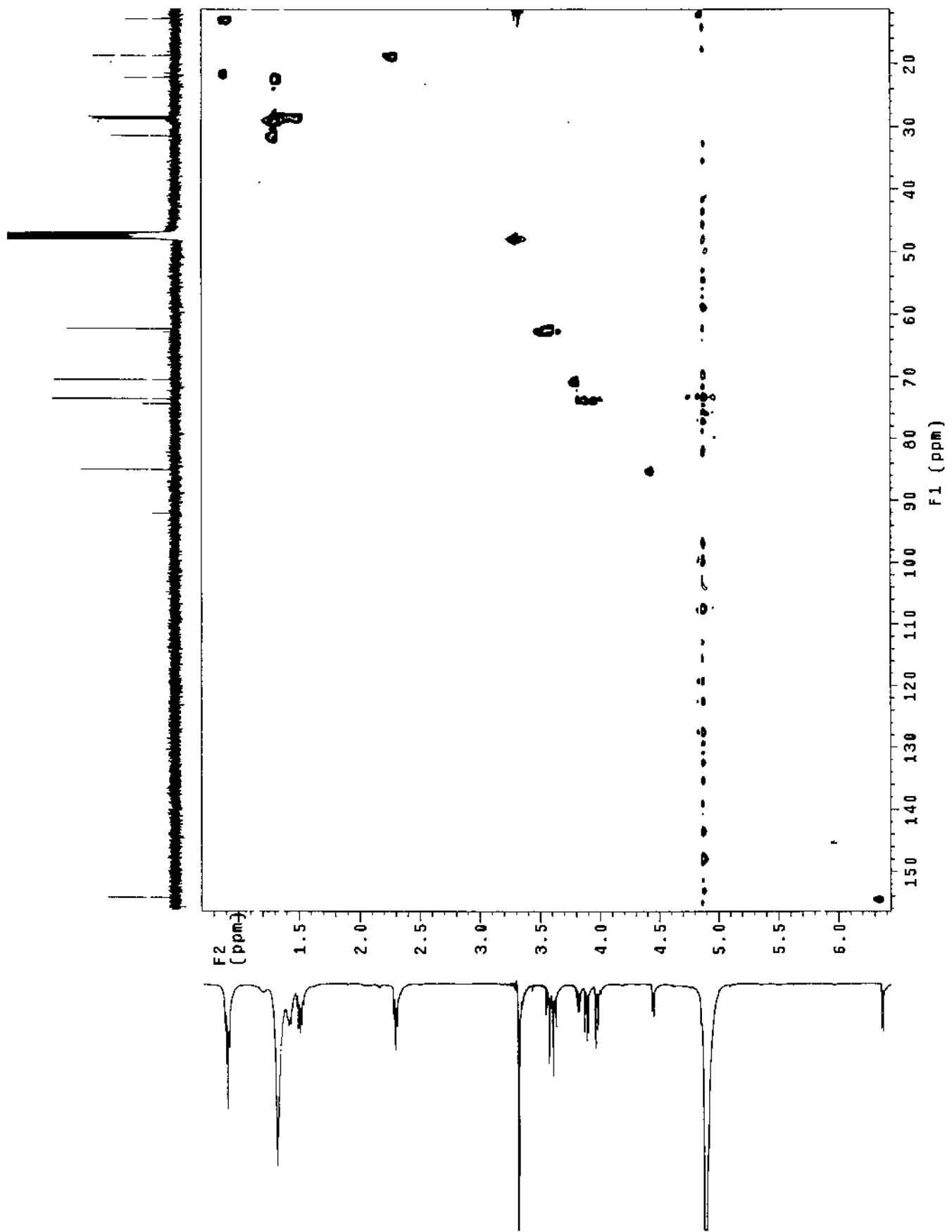


Fig. 3-54. HMQC spectrum of petroraspailyne B1(95B-8-S).

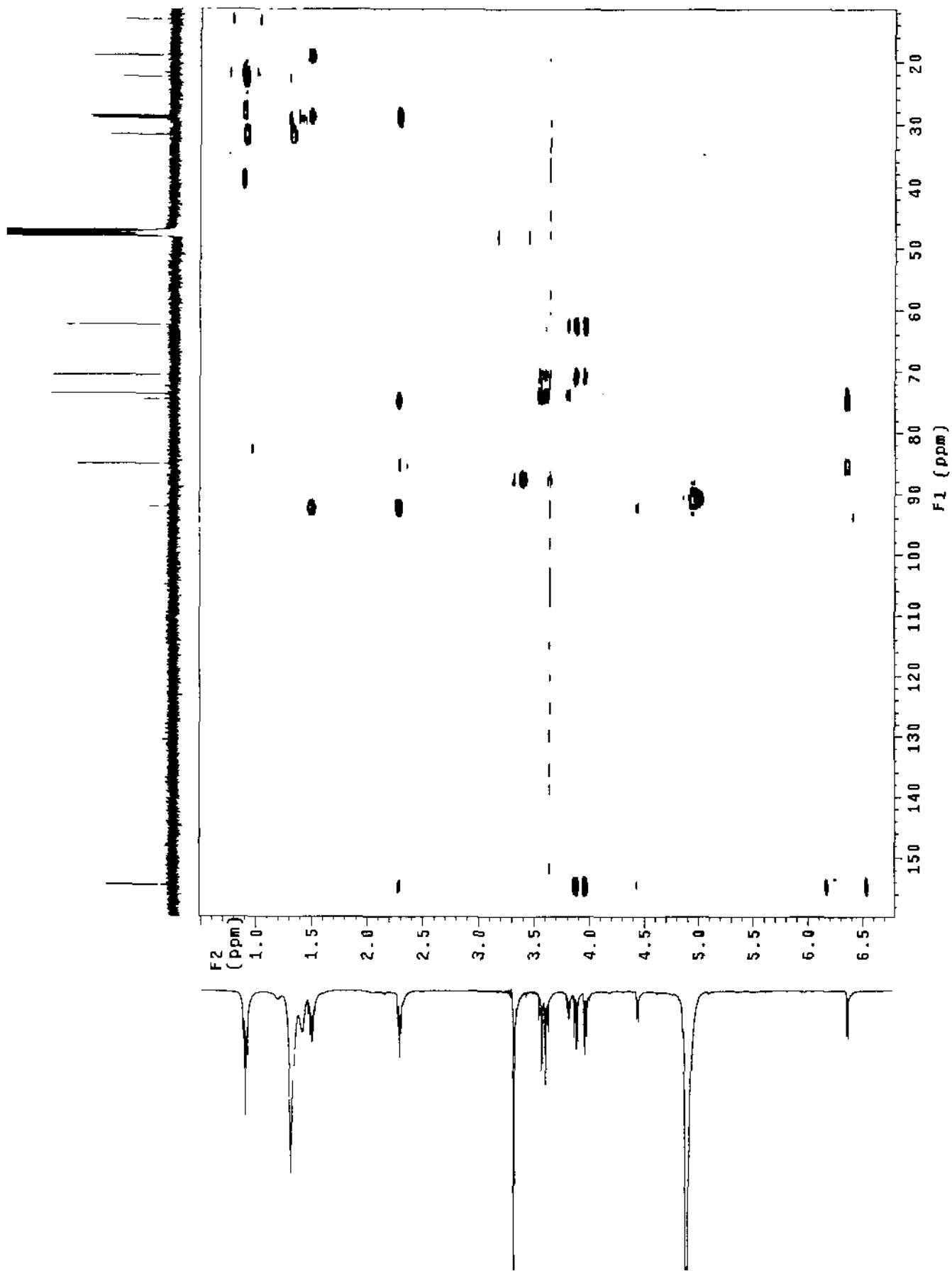


Fig. 3-55. HMBC spectrum of petroraspaillyne B1(95B-8-S).

[Mass Spectrum]

Data : K980202008

Date : 02-Feb-98 15:20

Sample: -KORD1:SYH_96X-1-T

Note : -in MeOH with NBA(Na)

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.05 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.4 deg.C

BP : m/z 135.8418

Int. : 1600.00

Output m/z range : 50.0000 to 359.1246

Cut Level : 0.00 %

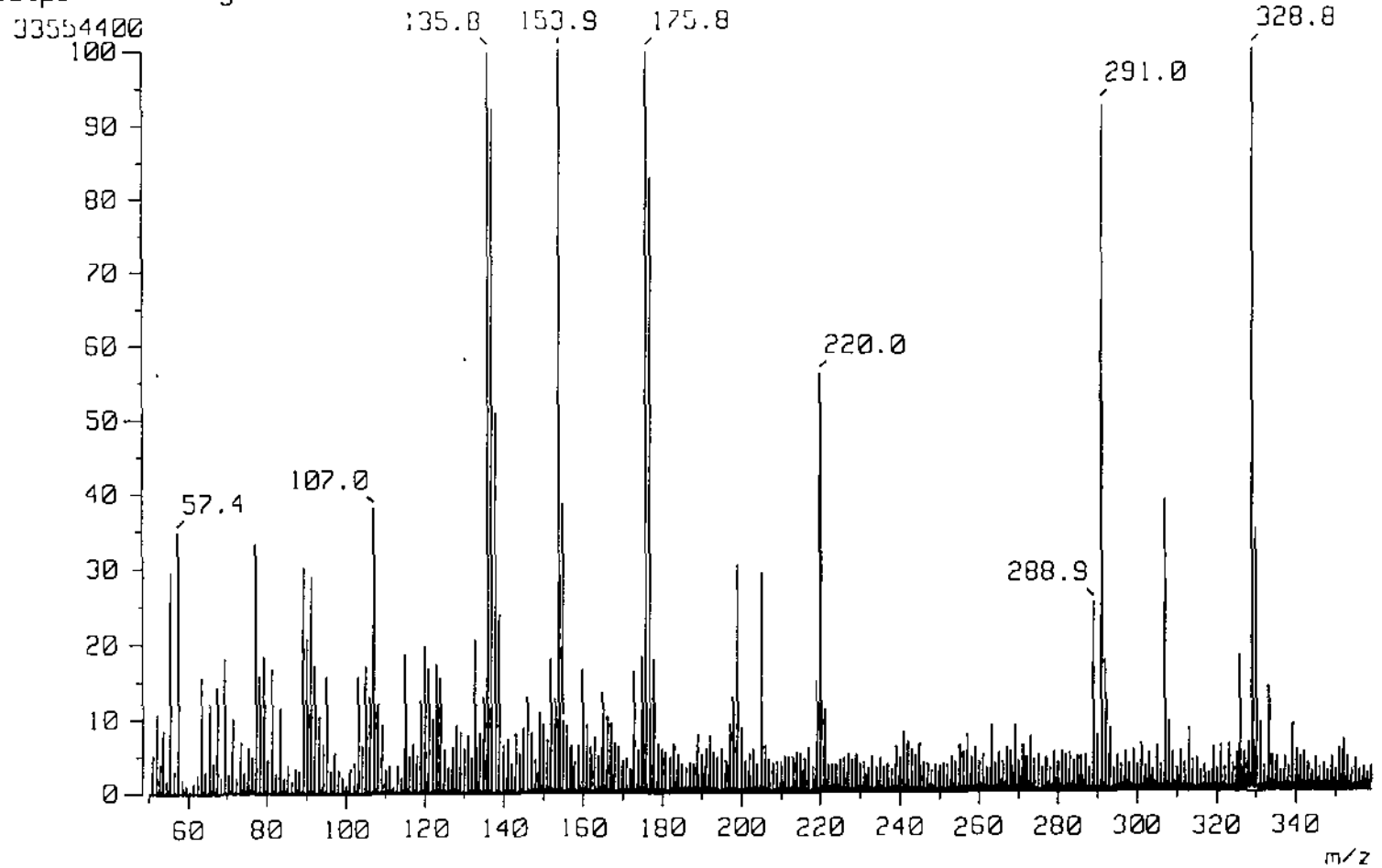


Fig. 3-56. HRMS spectrum of petroraspalliyne B2(95B-8-T).

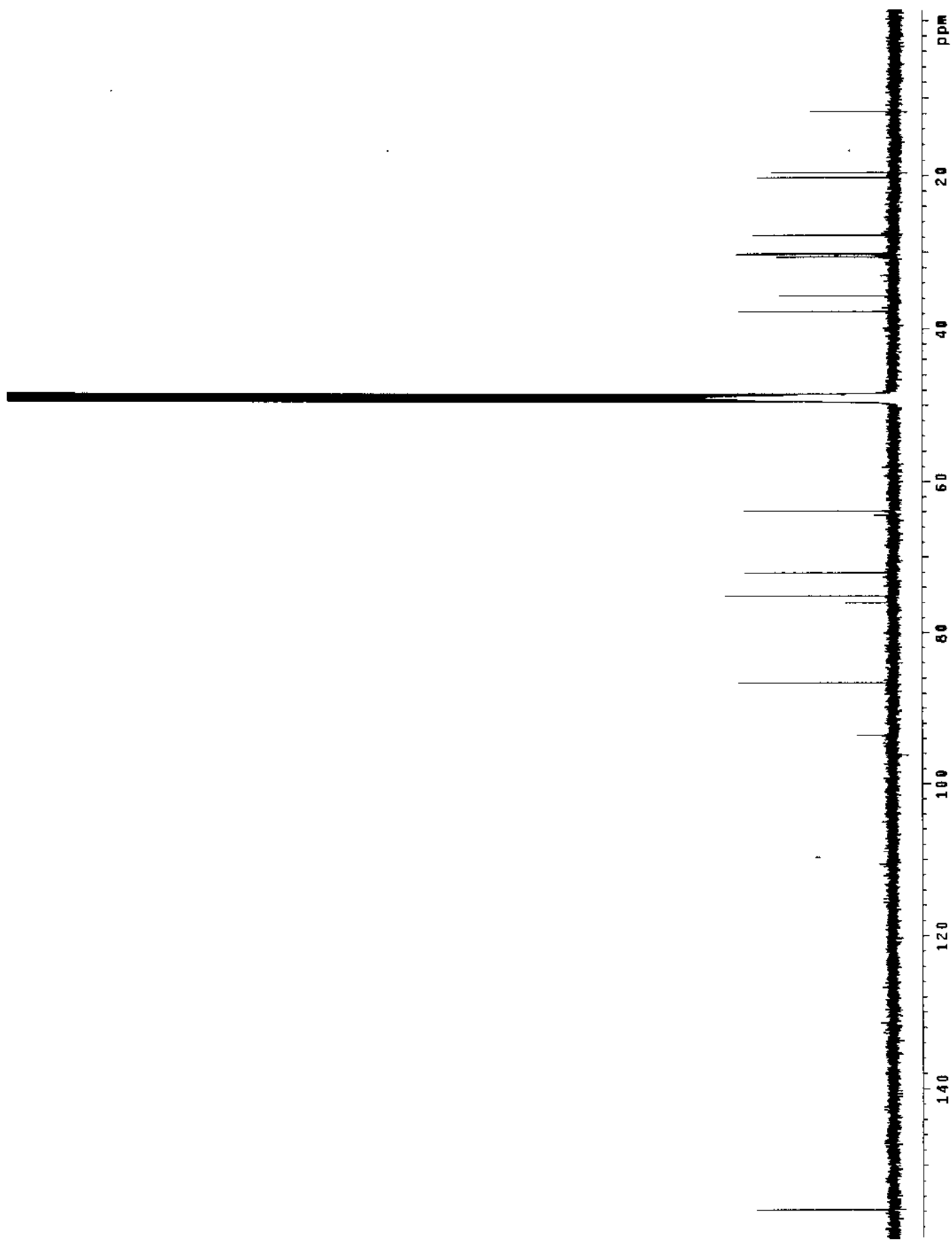


Fig. 3-57. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B2(95B-8-T).

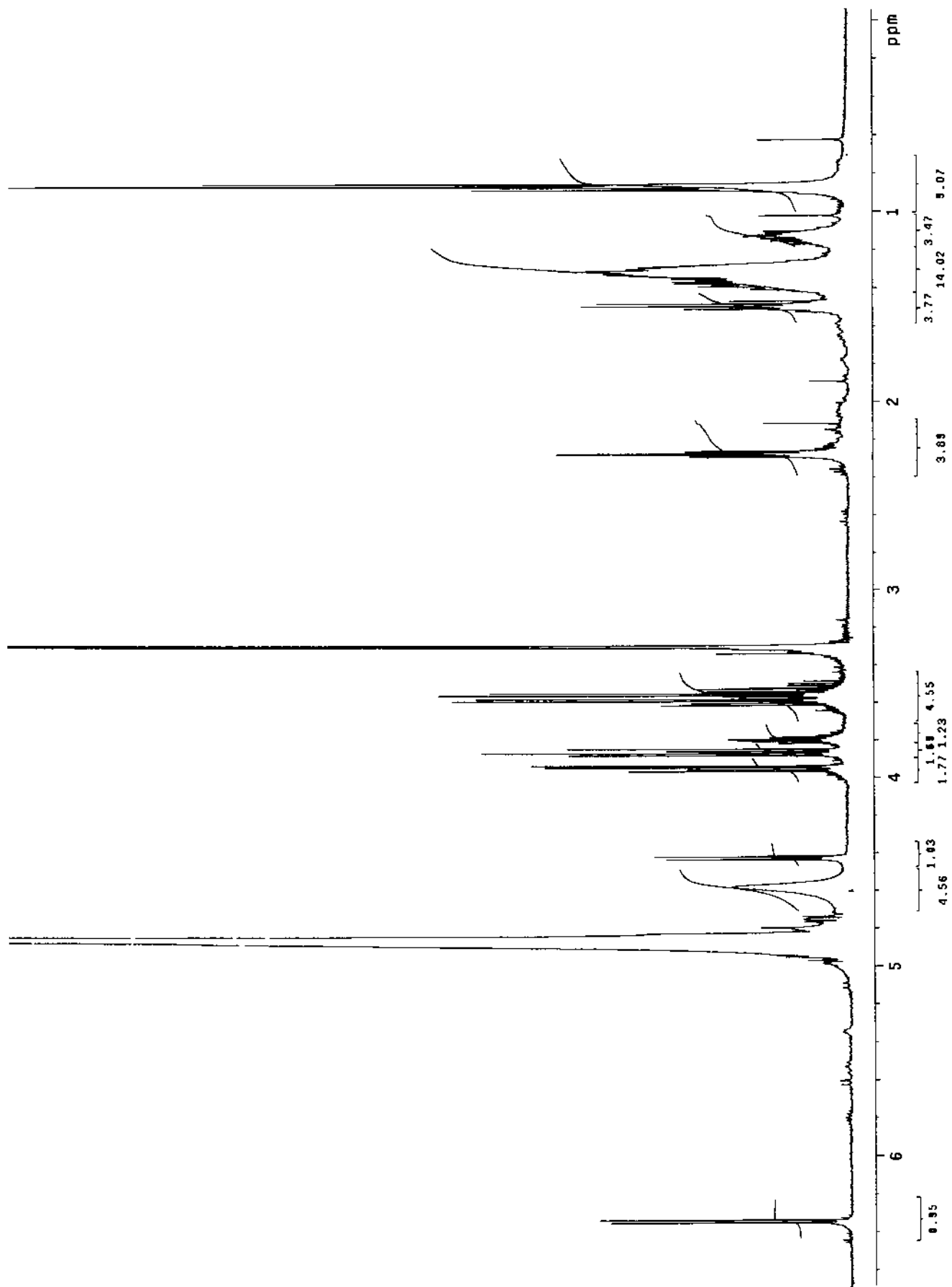


Fig. 3-58. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B2(95B-8-T).

[Mass Spectrum]

Data : K980119008

Date : 19-Jan-98 21:38

Sample: -GORDI:SYH_968-8-G

Note : -in MeOH with NBR(Na sat.)

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RI : 0.04 min

Scan# : (1,2)

Temp : 0.2 deg.C

BP : m/z 290.8710

Int. : 844.05

Output m/z range : 50.0000 to 349.7774

Cut Level : 0.00 %

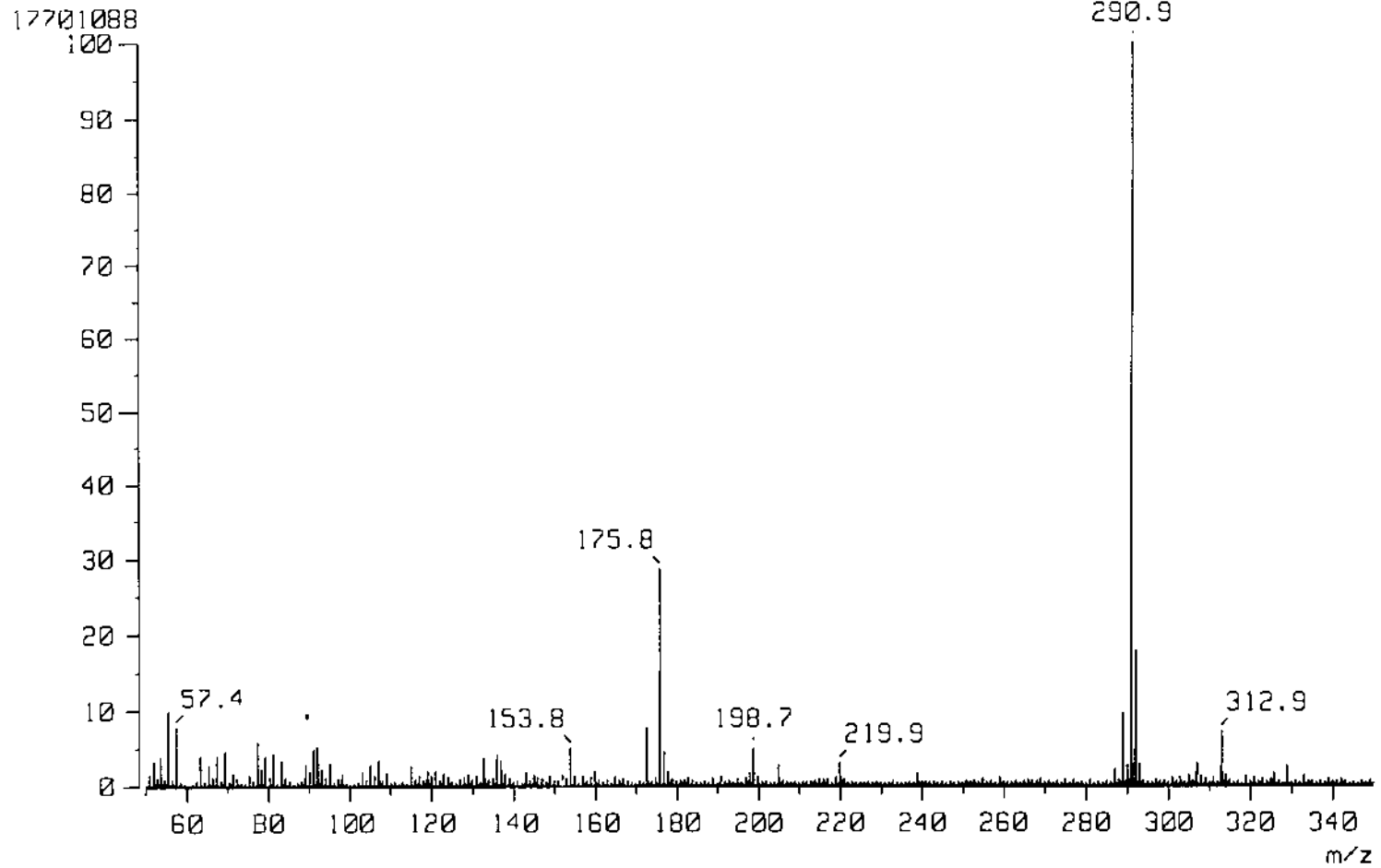


Fig. 3-59. HRMS spectrum of neuroraspalline B3(95B-8-G).

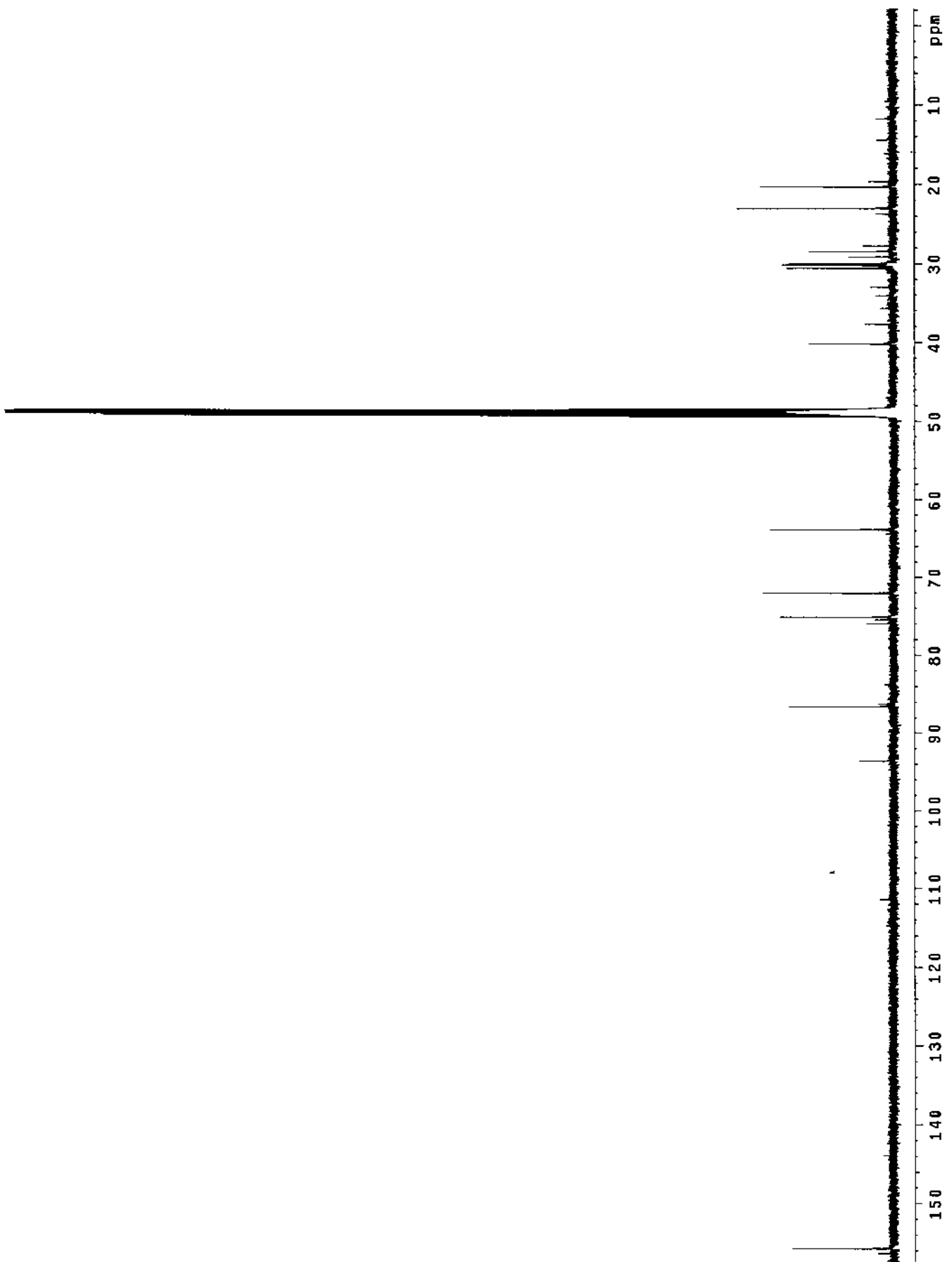


Fig. 3-60. Carbon NMR spectrum of petroraspaillyne B3(95B-8-G).

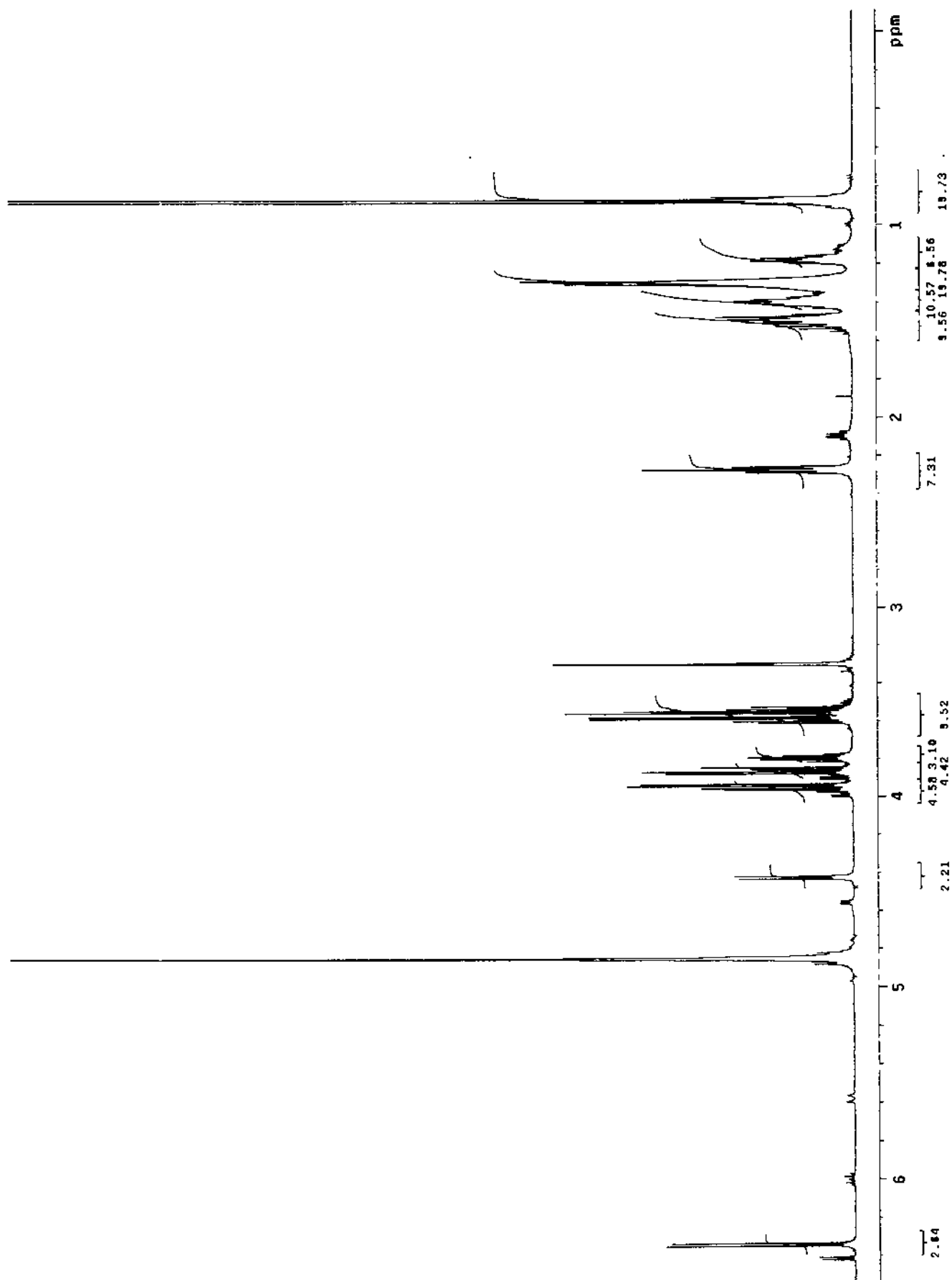


Fig. 3-61. Proton NMR spectrum of petroraspaillyne B3(95B-8-G).

File:2059623B Ident:5 Mer Def 0.25 Acq: 5-FEB-1996 18:34:56 +0:23 Cal:2059601B_1
70S CI+ Magnet BpM:207 BpI:4129355 TIC:28310020 Flags:NORM
File Text:Shin (KORDI) Unk# 917-1-A DCI (NH3)

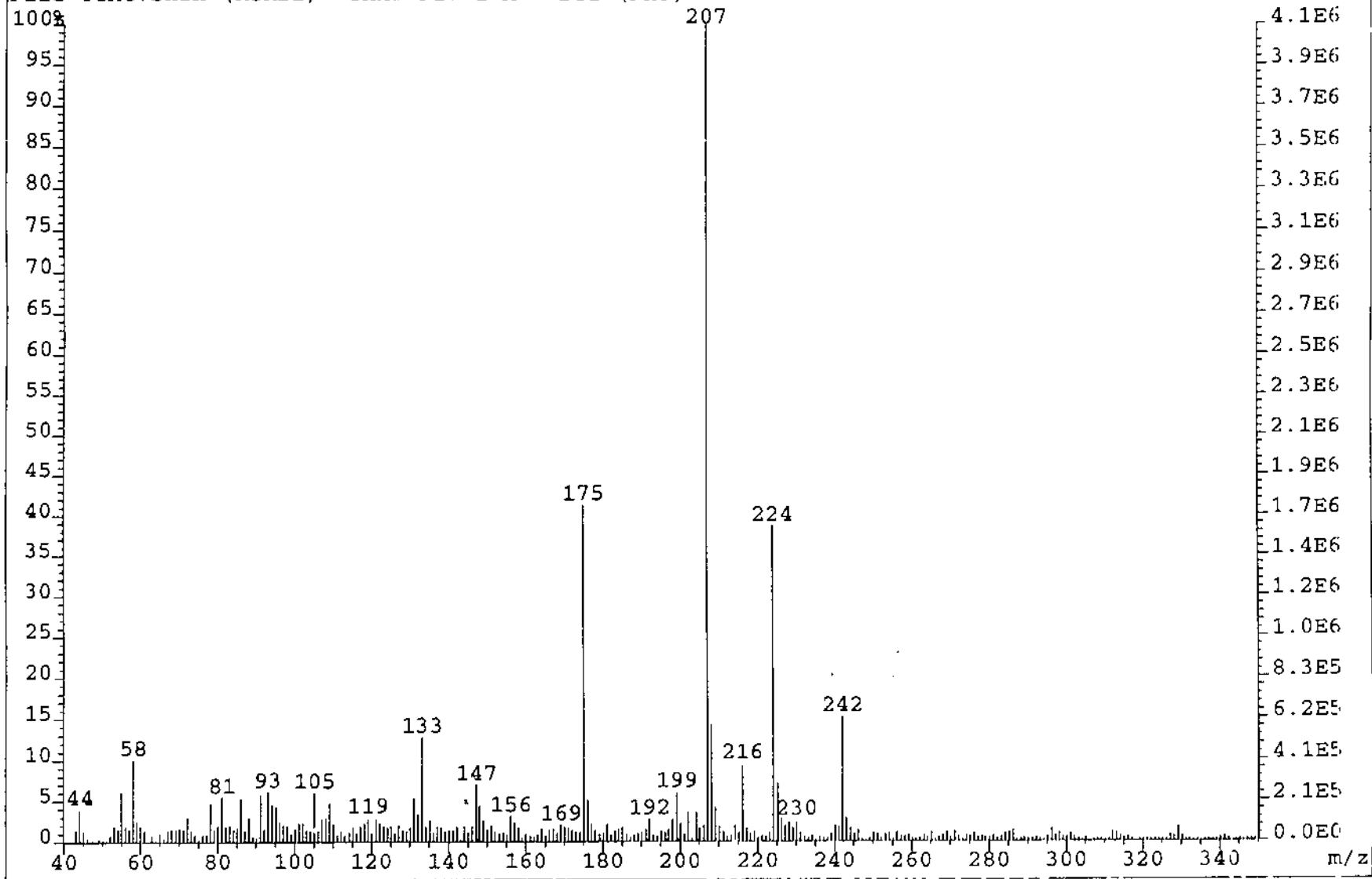


Fig. 3-62. HRMS spectrum of petrynol (95B-8-A).

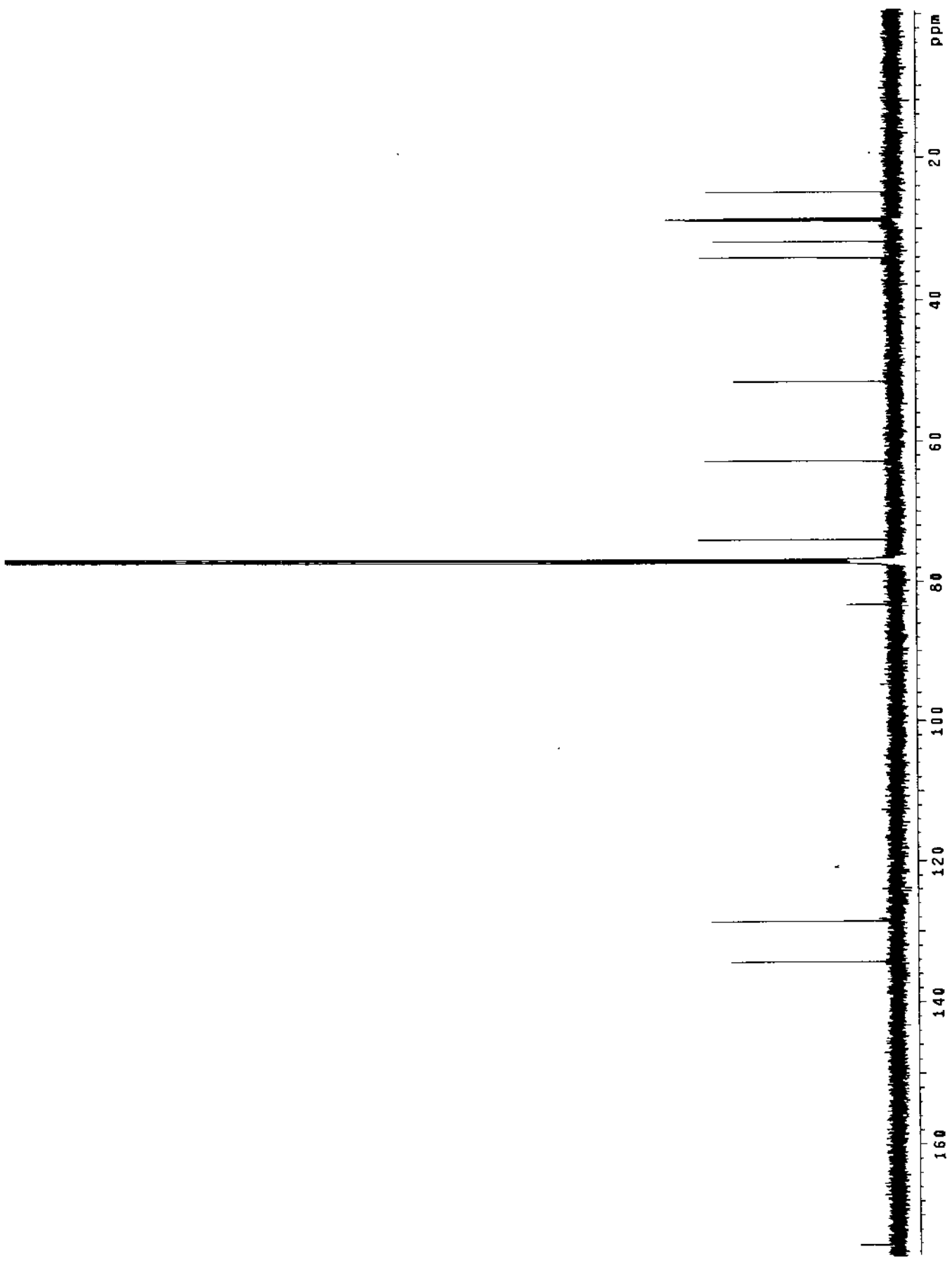


Fig. 3-63. Carbon NMR spectrum of petrynosol(95B-8-A).

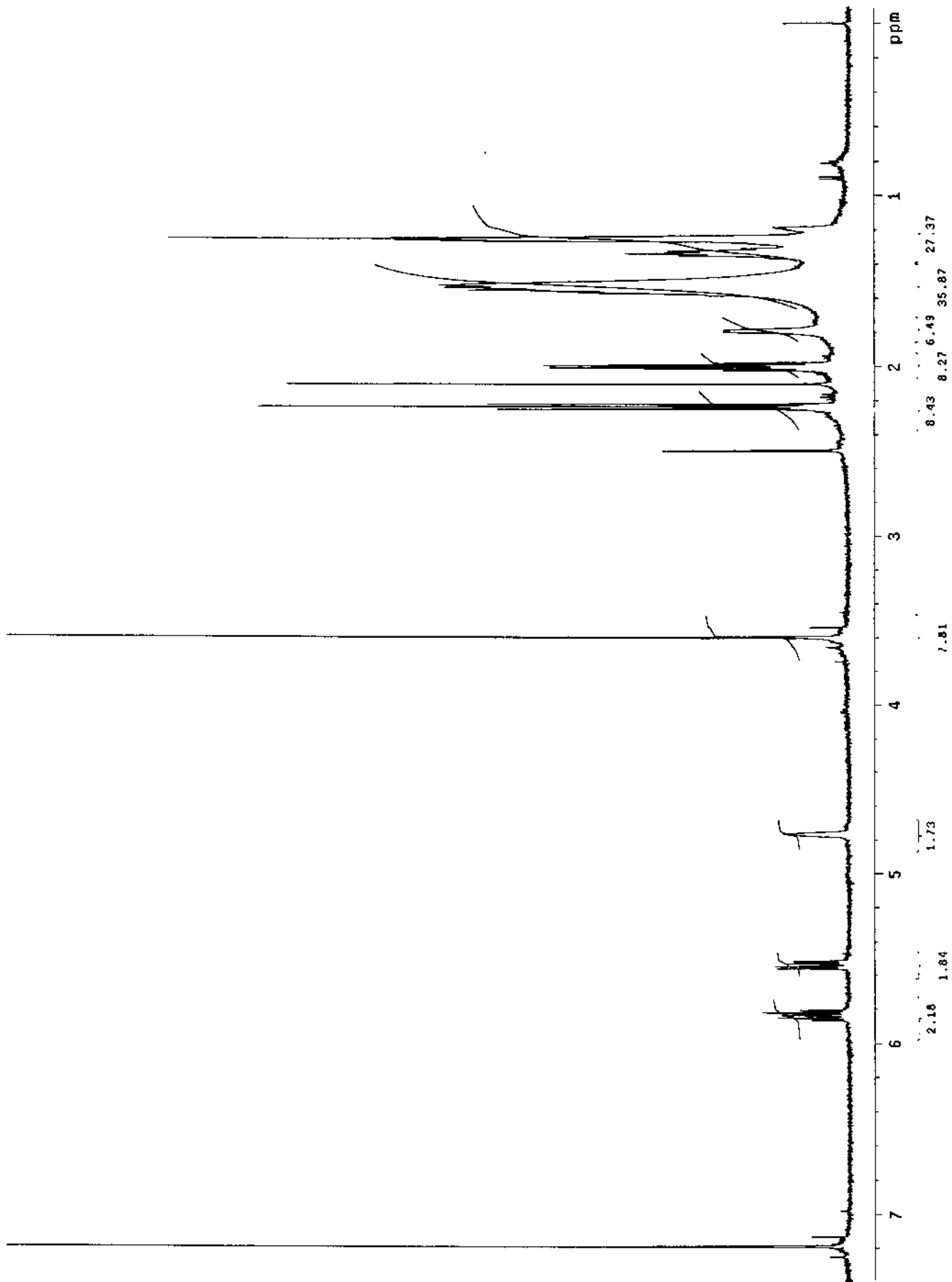


Fig. 3-64. Proton NMR spectrum of petrynol(95B-8-A).

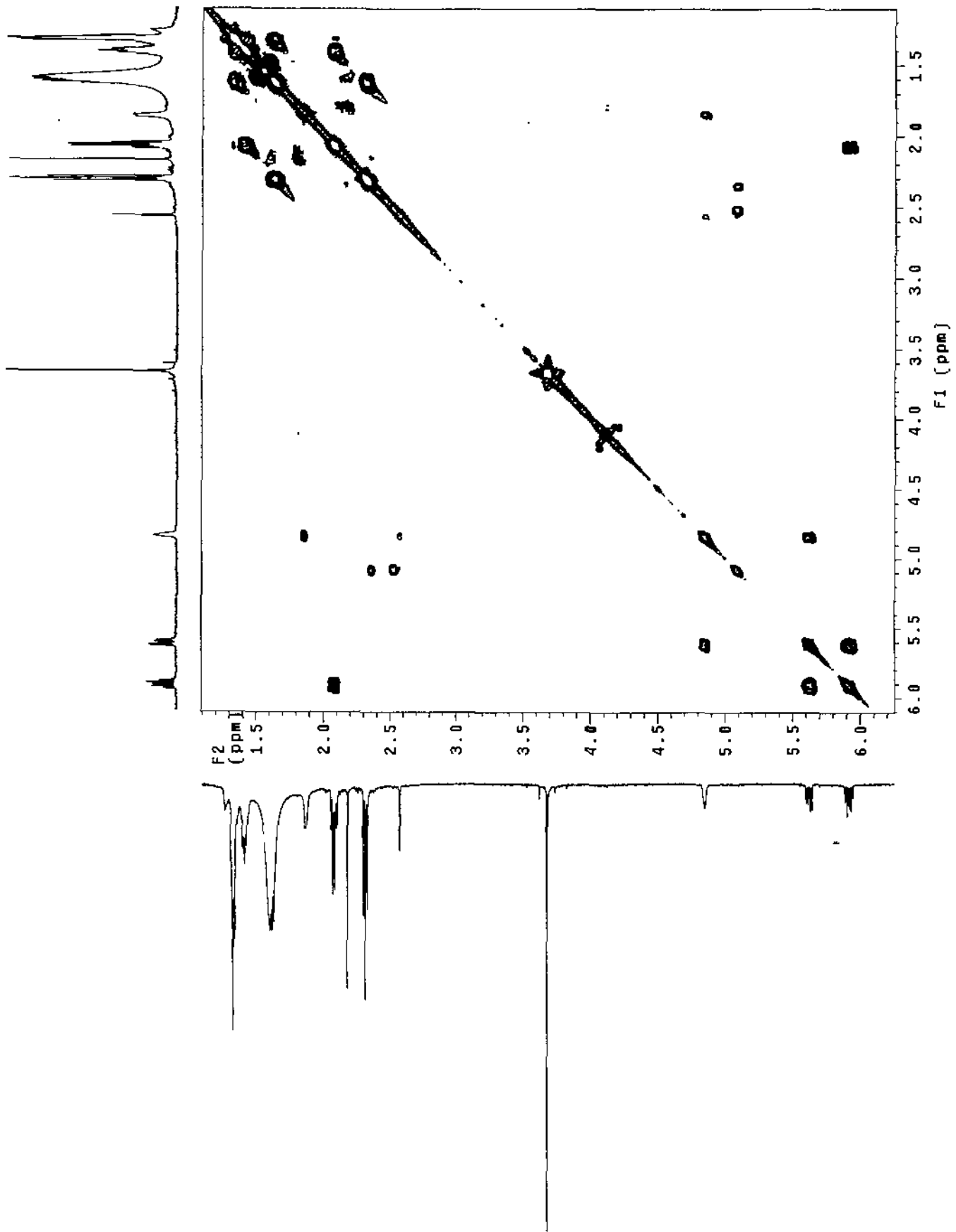


Fig. 3-65. Proton COSY spectrum of petrynoside (95B-8-A).

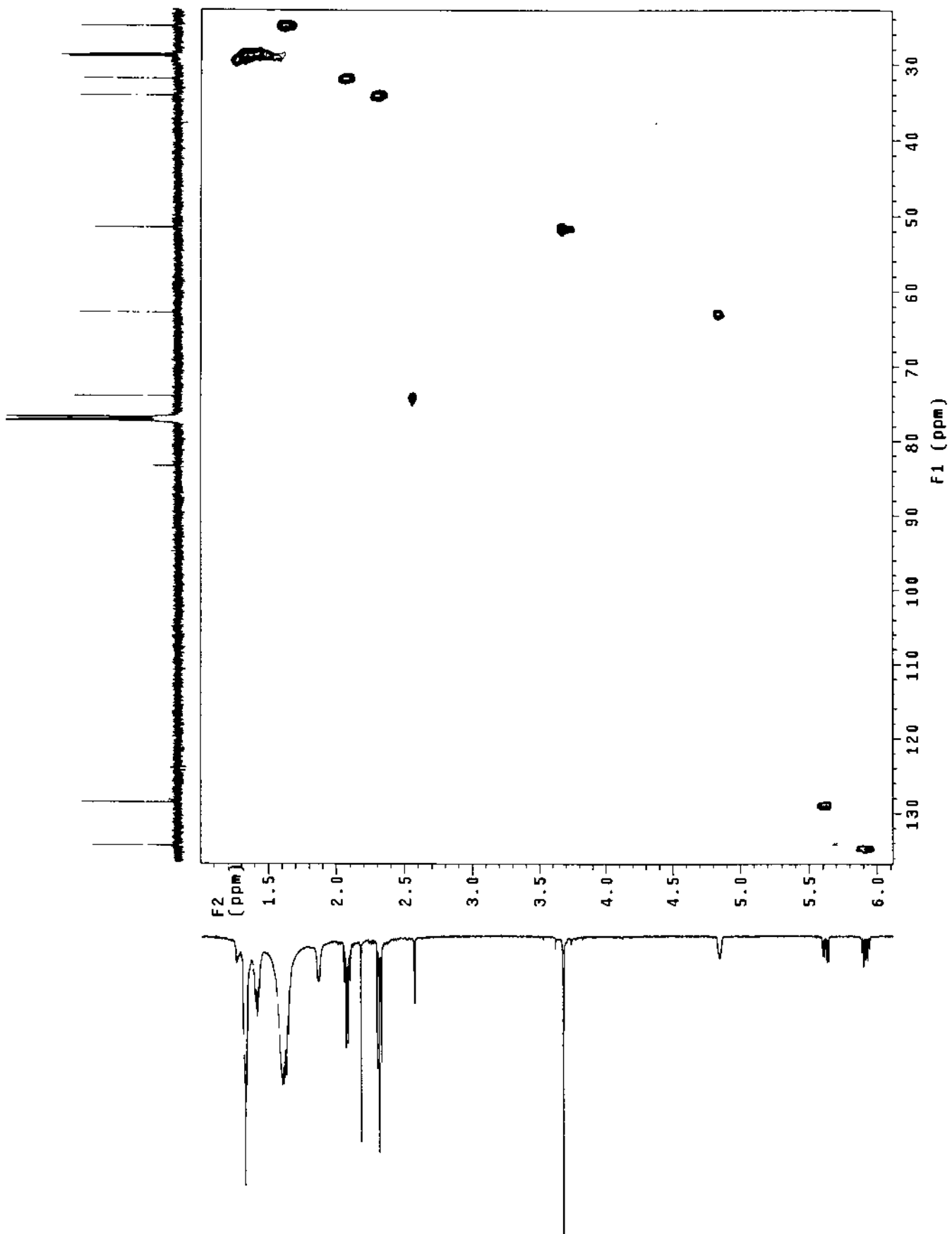


Fig. 3-66. HMQC spectrum of petrynol(95B-8-A).

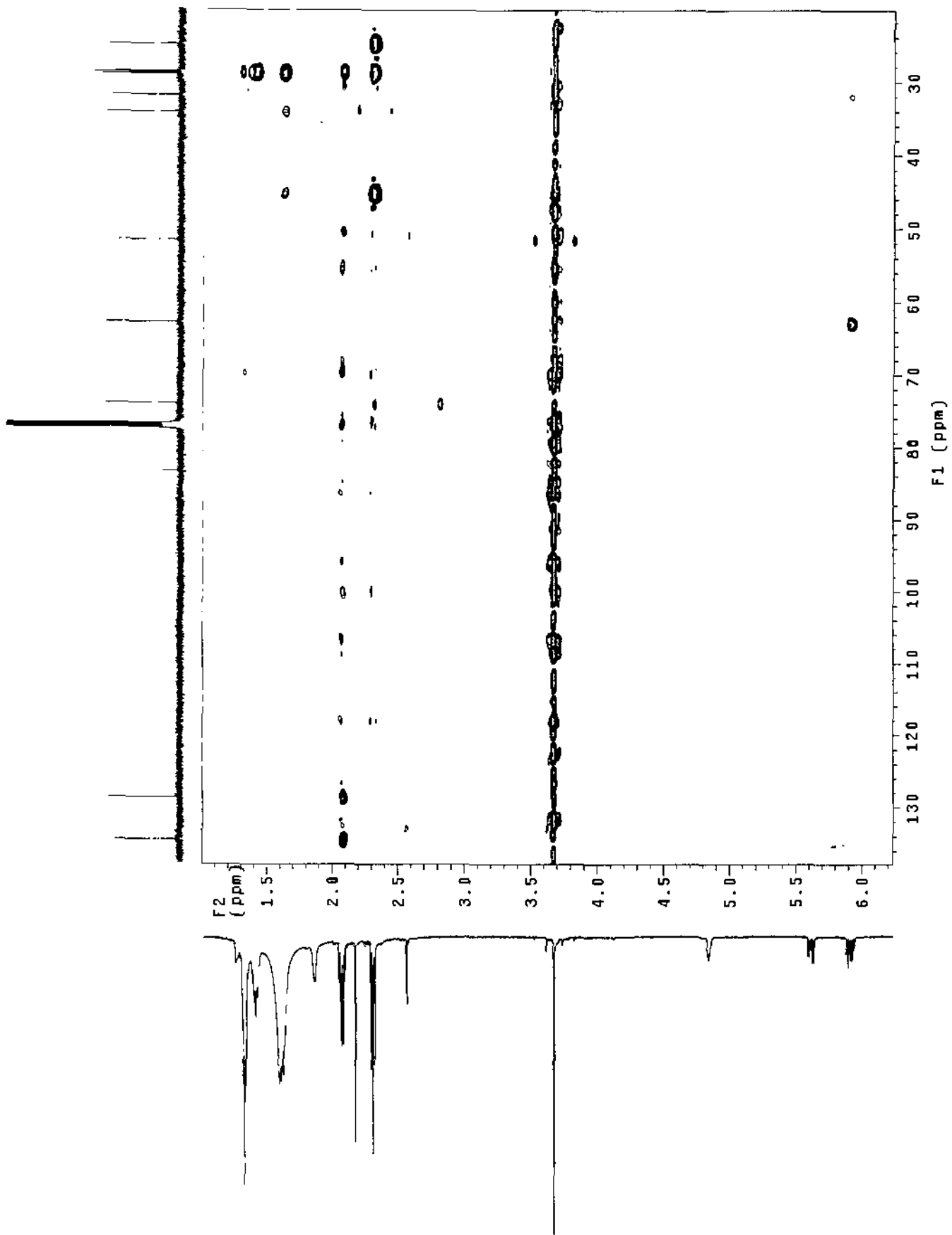


Fig. 3-67. HMBC spectrum of petrynlol(95B-8-A).

제 3 절 해면 *Tethya* sp.의 대사물질

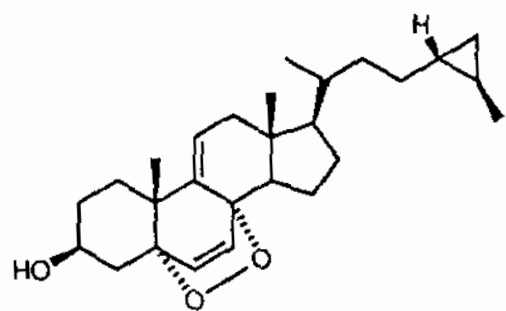
1. 서 론

해면 *Tethya* sp. (시료번호 96J-32)는 '96년 3월에 서귀포 근해 문섬과 차귀도 주변의 수심 10 - 20 m에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 현재 이 시료의 표본은 한남대학교 부설 자연사박물관의 해면동물 전시실에 시료번호 96J-32의 이름으로 전시되어 있다. 연한 갈색의 구형인(직경 2.0-2.5 cm) 이 시료는 채집 즉시 현장에서 드라이아이스로 냉동시킨 후 이 상태에서 연구소로 운반하여 냉동고에 보관되었다. 생리활성도 측정 결과 *Tethya* sp.는 brine-shrimp larvae에 대하여 중간 정도의 독성(LD₅₀ 290 ppm)을 나타내었으며 항진균 검색에서도 *Candida albicans*에 대하여 저해 활성을 나타내었다. 이 시료는 생물학적인 분류와 조추출물의 화학적 특성(¹H NMR, TLC)가 연구실에 냉동보관중인 기존의 시료(시료번호 91K-31: '91년 11월 거문도 및 백도 해역에서 채집)와 동일하였으므로 두 시료를 합하여 함께 분석하였다.

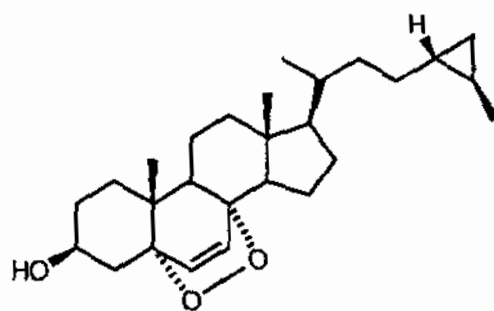
시료를 해빙시킨후 freeze-drier로 동결 건조한 후 건조된 시료에 대하여 methanol과 dichloromethane을 가하여 유기물질을 추출하였다. 각각의 용매를 증발시킨 후에 합한 조추출물을 *n*-hexane과 10% aqueous methanol의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였으며 hexane 층은 다시 silica vacuum flash chromatography, silica 및 reversed-phase HPLC 등을 이용하여 2차 대사물질을 분리하였다. 이 과정에서 brine-shrimp에 대한 독성 실험과 ¹H NMR spectrum으로 생리활성 물질을 추적하였다. 각각의 분획에 대한 정밀한 NMR 분석에 의하여 주요 대사물질이 steroids임이 드러났으나 steroids 또한 해면동물의 주요 천연물로 외국에서 연구가 집중되고 있는 계열의 물질이며 독특한 구조와 강력한 생리활성물질이 지속적으로 발견되고 있으므로 이들의 구조와 생리활성을 규명할 가치가 충분하다고 판단되어 연구를 계속하였다(Giner, 1993; D'Auria, et al, 1993; Faulkner, 1996; 1997). Chromatography로 분리한 천연물은 NMR을 비롯한 분광자료의 해석에 의하여 구조를 결정하였다. 각각의 이와 같은 방법으로 2개의 신물질을 포함하는 6개의 steroids의 구조가 결정되었다(Fig. 3-68).

2. Epidioxysteroids의 분리, 구조결정 및 생리활성

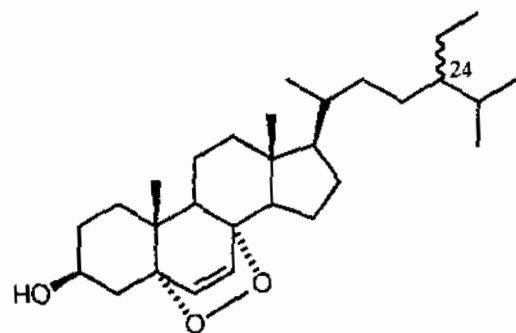
물질 96J-32-A는 백색의 무정형 고체로 분리되었다. 질량분석과 ¹³C NMR 분광자료의 해석에 의하여 이 물질의 분자식은 C₂₇H₄₀O₃ 로 결정되었다(Fig. 3-69 and 3-70). 이 물질은 ¹H NMR에서 steroid의 특징을 잘 나타내었다(Fig. 3-71). 즉 δ 3.99(1H, m)과 0.70(3H, s)에 나타난 peak들은 각각 cholesterol의 H-3과 H-18에 해당하는 것으로서



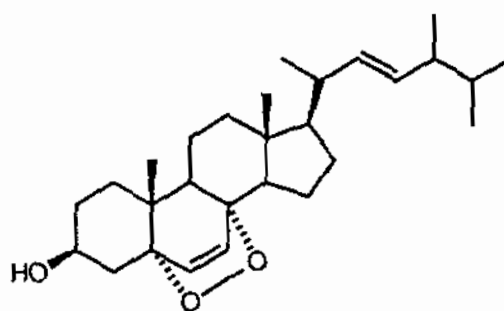
96J-32-A



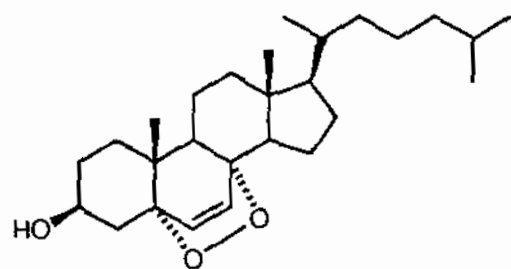
96J-32-B



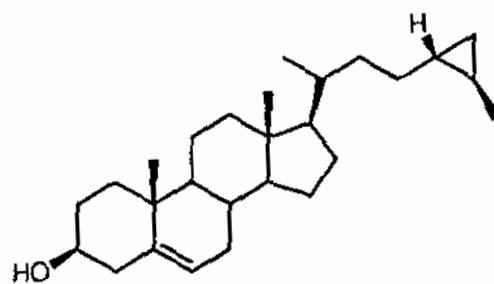
96J-32-C
(epimers at C-24)



96J-32-D



96J-32-E



96J-32-F

Fig. 3-68. Structures of steroids isolated from the sponge *Tethya* sp.

^{13}C NMR에서 나타난 바와 같이 27개의 탄소로 구성된 이 물질이 전형적인 cholestane계 steroid라는 것을 드러내었다. 적외선 분광분석에서 3400 cm^{-1} 에 강한 흡광 band가 나타난 반면 자외선 분광분석에서는 200 - 400 nm에 뚜렷한 흡광이 나타나지 않았으므로 이 물질은 alcohol로 생각되었다.

Proton NMR상에 있어서의 중요한 특징은 δ 6.58(1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$), 6.26(1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$) 및 5.40(1H, dd, $J = 6.3, 2.0\text{ Hz}$)에 나타난 3 개의 olefinic signal들로서 특히 δ 6.58과 6.26에 위치한 peak들의 splitting patterns는 하나의 isolated double bond의 존재를 드러내었다. 일반적으로 steroids에서는 C-4, C-5, C-22등 여러 위치에 double bonds가 존재할 수 있으나 isolated double bond는 극히 제한적으로 발견된다. (D'Auria, *et al*, 1993). 또한 olefinic protons의 chemical shifts가 상당히 낮은 것으로 보아 5,8-epidioxysteroids의 6,7-double bond에 해당하는 것으로 유추되었다. ^1H NMR상에서의 다른 특징은 δ 0.38(1H, m), 0.28(1H, m) 및 0.01(2H, m)등 대단히 upfield에 나타난 signal들로서 cyclopropane기의 존재를 드러내었다.

Proton NMR 상에서 드러난 특징들은 ^{13}C NMR 에서도 발견되었다(Fig. 3-70). δ 20.17(CH), 12.93(CH), 12.68(CH_2) 등 upfield에서 발견된 peak들은 disubstituted cyclopropane에 해당하였다. ^{13}C NMR과 DEPT실험에서 methyl signals가 일반적인 steroids에 비하여 1개 부족한 4개밖에 발견되지 않았는데 이것은 1개의 methyl기가 cyclopropane으로 변화되었음을 의미하였다. 또한 δ 142.38(C), 135.39(CH), 130.76(CH), 119.80(CH)에 나타난 signal들은 2개의 double bond의 존재를 드러내었다.

이러한 정보를 바탕으로 물질 92J-32-A의 개략적인 구조는 ^1H COSY와 HMQC등 2차원 NMR 실험에 의하여 규명되었다(Fig. 3-72 and 3-73). 먼저 이 물질에 존재하는 모든 수소와 이들과 결합되어 있는 탄소는 HMQC 실험에 의하여 정확히 assign 되었다(Table 3-2). ^1H COSY 실험에 의하여 수소 signals 간의 spin systems가 대부분 규명되었는데 key protons는 H-3(δ 3.99)와 H-21(δ 0.86)이었다. 먼저 H-3 으로부터 시작한 spin system의 추적은 이 물질이 cholesterol과 동일한 A ring을 갖고 있음을 드러내었다. HMQC 자료에서 H-4의 methylene protons는 δ 2.10과 1.90에서 발견되었는데 이들의 낮은 chemical shifts는 A/B ring junction의 C-5 위치가 oxidation된 것을 의미하였다. 따라서 δ 6.58과 6.26에서 나타난 isolated olefinic protons는 각각 H-6와 H-7에 해당하였다. 같은 방법으로 H-21 methyl protons로부터 시작한 proton spin system은 cyclopropyl protons에 까지 도달하였다. 이로서 물질 96J-32-A는 cholesterol의 C-26 methyl기가 cyclopropane으로 변한 탄소 골격을 갖고 있는 것이 확인되었다. 마지막으로 ^1H NMR spectrum에서 δ 5.40에 나타난 olefinic signal은 H-11 proton으로 결정되었는데 그 이유는 steroids의 전형적인 C-9(δ 50~60)에 해당하는 peak가 ^{13}C NMR spectrum에서 나타나지 않았으며 H-6와 H-7의 chemical shifts가 일반적인 5,8-epidioxysteroids 보다 상당히 downfield shift 되어 있기 때문이었다.

물질 96J-32-A의 구조에 대한 HMQC와 ^1H COSY자료의 해석은 HMBC 실험(H-C

Table 3-2. Proton and carbon NMR assignments for 96J-32-A.

#	H	C	HMBC (8 Hz)
1	2.07 (1H, m) 1.65 (1H, ddd, 13.7, 3.4, 3.4)	32.54	
2	1.91 (1H, m); 1.54 (1H, m)	30.59	
3	3.99 (1H, m)	66.33	
4	2.10 (1H, ddd, 13.7, 5.2, 1.7) 1.90 (1H, dd, 13.7, 11.7)	36.05	2, 3, 5, 10
5		82.70	
6	6.26 (1H, d, 8.8)	135.39	5, 8
7	6.58 (1H, d, 8.8)	130.76	5, 8
8		78.36	
9		142.38	
10		37.91	
11	5.40 (1H, dd, 6.3, 2.0)	119.80	8, 10, 13
12	2.25 (1H, dd, 17.1, 5.9) 2.05 (1H, br d, 17.1)	41.26	9, 11, 13, 14, 18
13		43.77	
14	1.80 (1H, dd, 12.2, 7.8)	48.01	7, 8, 13, 18
15	1.69 (1H, m); 1.58 (1H, m)	20.88	
16	1.95 (1H, m); 1.41 (1H, m)	28.10	
17	1.29 (1H, m)	55.99	
18	0.70 (3H, s)	12.75	12, 13, 14, 17
19	1.07 (3H, s)	25.53	1, 5, 9, 10
20	1.41 (1H, m)	34.92	
21	0.86 (3H, d, 5.9)	18.39	17, 22
22	1.49 (1H, m); 1.13 (1H, m)	35.52	
23	1.15 (2H, m)	30.59	
24	0.28 (1H, m)	20.17	
25	0.38 (1H, m)	12.93	
26	0.01 (2H, m)	12.68	
27	0.98 (3H, d, 5.9)	19.07	

Proton and carbon NMR data were measured in CDCl₃ solutions at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H COSY, HMQC, and DEPT experiments.

coupling constant 8 Hz)으로 증명되었다(Fig. 3-74). Olefinic protons와 upfield methyl protons들은 모두 주변의 탄소들과 여러 가지의 long-range couplings을 나타내었는데 특히 H-6과 H-7 및 H-11의 coupling은 각각 C-6 및 C-9(11) double bond의 존재를 명확히 입증하였다. 또한 terminal cyclopropane ring도 H-27과 인접한 탄소들간의 2-, 3-bond couplings에 의하여 증명되었다.

물질 **96J-32-A**는 여러 개의 비대칭 탄소 중심을 갖고 있다. 이들 중에서 C-5, C-8, C-24, C-25 등 4 위치의 비대칭 탄소는 일반적인 steroids에는 없는 것으로서 입체 배열의 결정이 요구되었다. 먼저 수소를 갖고 있지 않은 C-5와 C-8의 입체 배열은 ^1H NMR data에서 H-6, H-7, H-18 및 H-19의 chemical shifts를 알려진 유사물질과 비교하여 결정되었다. 근래에 보고된 물질 5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol은 H-6, H-7, H-18, H-19가 각각 δ 6.295, 6.606, 0.744, 1.099에서 발견되었다(Greca, *et al*, 1990). **92J-32-A**에서는 이들 수소가 각각 δ 6.26, 6.58, 0.70, 1.07에서 발견되어서 대단히 유사하였다(Table 3-2). 따라서 **96J-32-A**의 rings A-D의 입체 배열을 포함하는 구조는 5 α ,8 α -epidioxysteroid임이 분명하였다.

C-24와 C-25등 cyclopropane에 해당하는 비대칭 탄소 중심의 입체 배열은 NOESD 실험으로 결정되었다. δ 0.98에 위치한 H-27을 irradiation을 하였을 때 δ 0.38에 위치한 H-24의 signal intensity가 크게 증가하였다. 그러므로 C-24와 C-25의 상대배열은 24 R , 25 R 로 결정되었다. 그러나 이들 비대칭 탄소 중심은 C-17, C-20 등 다른 비대칭 탄소 중심과 공간적으로 멀리 떨어져 있으므로 절대 배열의 결정은 불가능하였다(Kobayashi, *et al*, 1993; Giner, 1993). 결론적으로 물질 **96J-32-A**는 5 α ,8 α -epidioxysteroid 계열에 속하는 신물질로 구조가 결정되었다.

유사한 물질인 **96J-32-B**가 무정형 백색 고체의 형태로 분리되었다(Fig. 3-68). 분자식이 $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$ 인 이 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 자료는 **96J-32-A**와 매우 유사하였다(Fig. 3-75~3-77). ^1H NMR 상에서의 중요한 차이는 **96J-32-A**의 H-11에 해당하는 signal(δ 5.40)이 사라졌으며 H-12의 signals(δ 2.25, 2.05)도 upfield로 상당히 이동하였다는 점이었다. 또한 H-6, H-7의 signals도 미미하나 upfield로 이동되었다(**96J-32-A**: δ 6.58, 6.26; **96J-32-B**: δ 6.49, 6.22). ^{13}C NMR spectrum에서도 동일한 변화가 관찰되었다. 즉 C-9(11) double bond에 해당하는 signals(δ 142.38, 119.80)이 사라졌으며 대신 upfield에 이에 해당하는 methine signals(δ 51.04, 23.43)가 발견되었다. 그러므로 **96J-32-B**는 **96J-32-A**의 C-9 double bond가 hydrogenate된 유도체임이 분명하였으며 ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 2-D NMR 실험에서도 완벽히 증명되었다(Table 3-3).

물질 **96J-32-A**와 마찬가지로 **96J-32-B**도 여러 개의 비대칭 탄소 중심을 갖고 있다. 먼저 수소를 갖고 있지 않은 C-5와 C-8의 입체 배열은 H-6, H-7, H-18 및 H-19의 chemical shifts의 비교로 접근되었다. C-5와 C-8에 dioxide가 결합된 형태는 3차원 구조상 5 α ,8 α -와 5 β ,8 β -만이 가능한데 이 부분의 입체구조에 따라 전기한 네 위치의 수

Table 3-3. Proton and carbon NMR assignments for 96J-32-B.

#	H	C	HMBC (8 Hz)
1	1.93 (1H, m) 1.67 (1H, ddd, 13.7, 3.4, 3.4)	34.70	
2	1.82 (1H, br dd, 12.7, 2.5) 1.53 (1H, m)	30.13	
3	3.95 (1H, m)	66.46	
4	2.09 (1H, br dd, 13.7, 3.4) 1.89 (1H, dd, 13.7, 13.7)	36.95	2, 3, 5, 10
5		82.13	
6	6.22 (1H, br d, 8.8)	135.32	5, 8, 10
7	6.49 (1H, d, 8.8)	130.71	5, 8
8		79.43	
9	1.47 (1H, m)	51.04	
10		36.93	
11	1.47 (1H, m): 1.18 (1H, m)	23.43	
12	1.96 (1H, m): 1.18 (1H, m)	39.42	
13		44.73	
14	1.56 (1H, m)	51.57	7, 8, 13, 18
15	1.61 (1H, m): 1.41 (1H, m)	20.65	13, 14
16	1.91 (1H, m): 1.37 (1H, m)	28.26	
17	1.15 (1H, m)	56.35	
18	0.78 (3H, s)	12.72	12, 13, 14, 17
19	0.86 (3H, s)	18.59	1, 5, 9, 10
20	1.37 (1H, m)	34.83	
21	0.85 (3H, d, 6.1)	18.20	17, 22
22	1.47 (1H, m): 1.09 (1H, m)	35.55	
23	1.13 (2H, m)	30.64	
24	0.27 (1H, m)	20.22	
25	0.37 (1H, m)	12.97	
26	0.09 (2H, m)	12.65	23, 24, 27
27	0.98 (3H, d, 5.9)	19.10	24, 26

Proton and carbon NMR data were measured in CDCl₃ solutions at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H COSY, HMQC, and DEPT experiments.

소가 영향을 받는다. 즉 5 α ,8 α -epidioxide에서는 H-6, H-7은 methyl기와의 steric proximity에 의한 interference 때문에 δ 6.248과 6.511에서 그리고 H-18, H-19는 oxygen과의 거리가 멀어졌으므로 δ 0.821과 0.888에서 각각 발견된다. 이에 비하여 5 β ,8 β -의 경우는 oxygen과의 steric proximity에 의하여 H-18, H-19의 signal이 각각 δ 1.175와 0.934로 downfield shift되는 반면 H-6, H-7의 protons는 이들 methyl기와 거리가 멀어져서 δ 5.565 및 5.894에서 발견된다(Greca, *et al*, 1990). 92J-32-B에서는 H-6, H-7, H-18, H-19가 각각 δ 6.26, 6.58, 0.70, 1.07에서 발견되었으므로 5 α ,8 α -epidioxysteroid로 해석되었다.

C-24와 C-25등 cyclopropane에 해당하는 비대칭 탄소 중심의 입체 배열은 NOEDS 실험으로 결정되었다. δ 0.98에 위치한 H-27을 irradiation을 하였을 때 δ 0.38에 위치한 H-24의 signal intensity가 크게 증가하였다. 그러므로 C-24와 C-25의 상대배열은 2*R*,25*R*로 결정되었다. 그러나 이들 비대칭 탄소 중심은 C-17, C-20 등 다른 비대칭 탄소 중심과 공간적으로 멀리 떨어져 있으므로 절대 배열의 결정은 불가능하였다. 문헌 및 database 조사 결과 96J-32-A와 마찬가지로 96J-32-B도 신물질임이 밝혀졌다(Fig. 3-68).

96J-32-A와 -B 외에도 여러 가지 epidioxysteroids가 함께 분리되었으며 구조가 결정되었으나 모두 이미 외국연구진에 의하여 보고된 바가 있는 물질들이었으므로 간단히 언급한다. 먼저 흰 고체로 분리된 물질 96J-32-C의 분자식은 HRMS에 의하여 C₂₉H₄₈O₃로 결정되었다(Fig. 3-78). 그러나 이 물질의 ¹³C NMR spectrum에서는 29개 대신에 41개의 탄소 signal이 발견되었다(Fig. 3-79). 또한 충분한 relaxation time을 주었는데도 불구하고 탄소의 signal intensity가 서로 매우 상이하였다. 그러므로 96J-32-C는 유사한 두 물질의 혼합물로 생각되었다. 각각의 물질을 순수하게 분리하기 위하여 여러가지 다양한 조건에서 HPLC를 하였으나 성공하지 못하였다. 그래서 혼합물 상태에서 NMR 해석으로 물질구조의 결정을 시도하였다. 먼저 이 물질의 NMR 데이터에서 downfield에 위치한 proton과 carbon의 chemical shifts가 96J-32-B와 매우 유사하였다(Fig. 3-80). 두 물질의 NMR 자료를 세밀히 비교한 결과 물질 96J-32-C도 96J-32-B와 동일한 5 α ,8 α -epidioxo-3-hydroxysteroid임이 밝혀졌다. 또한 ¹³C NMR에 나타난 41개의 signals 중에서 steroid의 rings A-D에 해당하는 signals 들은 모두 peak intensity가 강하며 서로 유사하였다. 따라서 96J-32-C는 side chain의 입체구조가 다른 이성질체의 혼합물임이 분명하였다. ¹H COSY, ¹³C NMR과 DEPT 실험에 의하여 minor peaks를 assign 한 결과 96J-32-C는 cholestane의 C-24 위치에 ethyl기가 접합된 stigmasterol 계열의 물질임이 밝혀졌다. Stigmasterol의 side chain은 C-24에 asymmetric center를 갖고 있으므로 96J-32-C는 이 위치의 입체배열이 서로 다른 두 물질 즉 5 α ,8 α -epidioxo-24-ethyl-cholest-6-en-3 β -ol의 혼합물로 생각되었다. 이 해석을 지지하는 증거로는 C-23~C-29등 C-24 및 그 주변에 위치한 탄소들은 chemical shifts의 편차가 비교적 큰데 비하여(~0.2 ppm) C-17, C-20, C-21, C-22 등

asymmetric center로부터 멀리 떨어진 탄소들은 편차가 적다(< 0.1 ppm) 이었다. 동일한 위치에 해당하는 탄소 signal의 크기로 미루어 두 epimers 간의 양적인 비는 3:2 정도로 추정되었다. 문헌조사 결과 두 isomers 모두 해면 *Tethya aurantia*와 군체멍게 *Ascidia nigra*, 산호 *Dendrogyra cylindrus* 등에서 발견된 바 있음이 밝혀졌다 (Gunatilaka, et al, 1981; Findlay & Patil, 1984; Mishra, et al, 1996).

흰 고체형태로 분리된 물질 **96J-32-D**의 분자식은 HRMS와 ^{13}C NMR에 의하여 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-81 and 3-82). 이 물질의 NMR data는 **96J-32-B**와 매우 유사하였다. ^{13}C NMR 상에 있어서의 차이점은 cyclopropane에 해당하는 peak들이 사라졌으며 그 대신 δ 135.40과 132.39에 olefinic signal이 새로이 나타났으며 ^1H NMR에서도 δ 5.19(1H, dd, $J = 15.1, 7.8$ Hz), 5.13(1H, dd, $J = 15.1, 7.8$ Hz)에서 disubstituted olefin의 전형적인 signal이 관찰되었다(Fig. 3-83). 두 물질의 ^{13}C NMR을 세밀히 비교한 결과 **96J-32-D**는 **96J-32-B**와 동일한 ring structure를 갖고 있음을 확인하였다. 그러므로 **96J-32-D**는 **96J-32-B**의 side chain에 존재하는 cyclopropane ring이 열려있으며 그 대신에 새로운 double bond를 갖고 있는 유도체로 생각되었다. ^1H COSY와 proton decoupling 실험으로 side chain의 proton spin system을 추적한 결과 double bond의 위치가 C-22임을 밝혀내었다. 이와 같이 물질 **92J-32-D**는 5 α ,8 α -epidioxysteroid-cholesta-6,22-dien-3 β -ol로 구조가 결정되었다(Fig. 3-68).

문헌조사 결과 이 물질은 해면 *Axinella cannabina*, *Raphidostila incisa*, *Tethya aurantia*, *Thalysias juniperina*, 멍게 *Ascidia nigra*, 산호 *Dendrogyrus cylindrus* 등 다양한 해양 저서 군체동물로부터 발견된 바 있음을 확인하였으며 분광자료도 동일하였다 (Gunatilaka, et al, 1981; Findlay & Patil, 1984; Iguchi, et al, 1993; Anjaneyulu, et al, 1995; Mirsha, et al, 1996).

물질 **96J-32-E**의 분자식은 HRMS와 ^{13}C NMR자료에 의하여 $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 로 결정되었다. 이 물질의 분광자료는 **96J-32-D**와 매우 유사하였으며 특히 rings A-D에 해당하는 수소와 탄소 signal의 위치와 형태는 거의 동일하였다(Fig. 3-84 and 3-85). NMR 상에 있어서의 유일한 차이점은 **96J-32-D**의 C-22 double bond에 해당하는 signal이 upfield methylene signal로 대체되었다는 점이었다. 그러므로 물질 **96J-32-E**는 5 α ,8 α -epidioxysteroid-cholest-6-en-3 β -ol임이 분명하였다. **96J-32-D**와 마찬가지로 이 물질 역시 여러 저서군체동물에서 분리되었으며 특히 연체동물 *Aplysia dactylomela*에서는 epidioxysteroids중 주대사물질로 분리된 바 있다(Gunatilaka, et al, 1981; Findlay & Patil, 1984; Iguchi, et al, 1993; Anjaneyulu, et al, 1995; Mirsha, et al, 1996).

시료 96J-32의 조추출물에는 **96J-32-A** ~ **E** 등의 epidioxysteroids 이외에도 cholesterol 등 여러 가지 종류의 steroids가 함께 존재하였다. 그러나 이들의 대부분은 육상과 해양생물을 망라하고 여러생물에서 흔히 발견되는 것이므로 비교적 드물게 발견되는 cyclopropyl steroid계열에 속하는 물질 **96J-32-F**만 분리하여 ^1H , ^{13}C NMR과

HRMS 자료의 해석에 의하여 25(26)-cyclopropylcholesterol로 구조를 확인하였다(Fig. 3-86 and 3-87; Fig. 3-68).

Epidioxysteroids는 항미생물 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Shin, 1989). 따라서 본 연구에서 분리된 새로운 물질 96J-32-A와 -B에 대해서도 다양한 수종의 박테리아와 진균에 대한 활성을 측정하였다. Paper disk method를 이용하여 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli* 등의 일반세균과 진균 *Candida albicans*에 대한 활성을 측정한 결과 96J-32-A와 -B는 20 μ g/ml의 농도에서 중간 정도의 활성(inhibition zone 7-12 mm)을 나타내었다. 또한 brine-shrimp 독성검색에서도 약한 활성(LC₅₀ 96 and 41 ppm)을 나타내었다.

3. 실험방법

가. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

해면 *Tethya sp.* (시료 번호 96J-32)는 '96년 3월에 서귀포 근해 문섬과 차귀도 주변의 수심 10 - 20 m에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 채집한 시료는 현장에서 즉시 dryice로 냉동시킨 후 이 상태에서 연구소로 운반하여 냉동고(-25°C)에 보관되었다. 이 시료는 생물학적인 분류와 조 추출물의 화학적 특성(¹H NMR, TLC)가 본 연구실에 보관중인 기존의 시료(91K-31; '91년 11월 거문도 및 백도해역에서 채집)와 동일하였으므로 함께 분석하였다. 시료를 해빙시킨후 freeze-drier로 동결 건조한 후 건조된 시료(건조 중량 280g)를 비이커에 넣고 methanol(1 L x 3)과 dichloromethane(1 L x 3)을 가하여 유기물질을 추출하였다. 용매를 증발시킨후 합한 조추출물(11.95 g)을 *n*-hexane과 10% aqueous methanol의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였다(*n*-hexane: 2.87 g, aqueous methanol: 8.14 g). 생리활성 측정결과 hexane층이 brine-shrimp larvae에 대한 중정도(LD₅₀ 126 ppm)의 활성을 나타내었다. Hexane층은 acetone을 이용하여 silica에 흡착시킨 후 silica vacuum flash chromatography(10 cm x 7 cm, 60PF₂₅₄)를 하였다. 용출한 용매는 hexane과 ethyl acetate의 혼합액으로서 100% hexane으로부터 시작하여 100% ethyl acetate에 이르기까지 10% gradient system을 이용하였다. 250 mL씩 용출한 각각의 분액을 감압 건조한 뒤 중량과 ¹H NMR을 측정하였다. 이 결과 20-40% ethyl acetate/hexane로 용출한 분액에 2차 대사물질이 함유되어 있음을 확인하였다.

나. 천연물의 분리

2차 대사물질이 함유된 분액을 합하여 저온에서 감압건조를 하였다. 남은 고체물질 (0.87 g)을 40% ethyl acetate/hexane에 녹인 뒤 silica Sep-pak column(Alltech, 1 cm x 1.5 cm)을 통과시켜 극성 불순물을 제거하였다. 용출액을 다시 건조시킨 후 silica HPLC(30% ethyl acetate/hexane, YMC silica column, 1 cm x 25 cm, Shodex RI detector, 2.5 mL/min)를 한 결과 retention time 38 - 41 min에 2차 대사물질이 혼합물로서 분리되었다. 이 혼합물을 다시 reversed-phase HPLC(80% acetonitrile/methanol, Shiseido Capcell ODS column, 1 cm x 25 cm, Waters RI detector, 2.5 mL/min)로 분리한 결과 5 개의 물질(95J-32-A, -B, -C, -D, -E)이 얻어졌다. 각각의 retention time은 17, 20, 23, 24, 31 min이었으며 분리한 물질의 양은 각각 12.7, 49.2, 16.5, 58.0, 31.7 mg 이었다. 한편 silica HPLC의 retention time 16 min에서 얻은 혼합물을 reversed-phase HPLC(100% MeOH, Shiseido Capcell ODS column, 2 ml/min)으로 분리하여 47.8 mg의 물질 96J-32-F가 retention time 31 min에서 얻어졌다.

96J-32-A. amorphous white solid; mp 89-90°C; IR (KBr) 3400 (broad), 2950, 2920, 2860, 1460, 1380, 1080, 1030, 970, 870, 680 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.58 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-7), 6.26 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 5.40 (1H, dd, $J = 6.3, 2.0$ Hz, H-11), 3.99 (1H, m, H-3), 2.25 (1 H, dd, $J = 17.1, 5.9$ Hz, H-12), 2.10 (1H, ddd, $J = 13.7, 5.2, 1.7$ Hz, H-4), 2.07 (1H, m, H-1), 2.05 (1H, m, H-12), 1.95 (1H, m, H-16), 1.91 (1H, m, H-16), 1.90 (1H, dd, $J = 13.7, 11.7$ Hz, H-4), 1.80 (1H, dd, $J = 12.2, 7.8$ Hz, H-14), 1.69 (1H, m, H-15), 1.65 (1H, ddd, $J = 13.7, 3.4, 3.4$ Hz, H-1), 1.58 (1H, m, H-15), 1.54 (1H, m, H-2/-23), 1.49 (1H, m, H-22), 1.41 (2H, m, H-16, -20), 1.29 (1H, m, H-17), 1.15 (2H, m, H-2, -23), 1.13 (1H, m, H-22), 1.07 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-27), 0.86 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-21), 0.70 (3H, s, H-18), 0.38 (1H, m, H-25), 0.28 (1H, m, H-24), 0.01 (2H, m, H-26); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 142.38 (C, C-9), 135.39 (CH, C-6), 130.76 (CH, C-7), 119.80 (CH, C-11), 82.70 (C, C-5), 78.36 (C, C-8), 66.33 (CH, C-3), 55.99 (CH, C-17), 48.01 (CH, C-14), 43.77 (C, C-13), 41.26 (CH_2 , C-12), 37.91 (C, C-10), 36.05 (CH_2 , C-4), 35.52 (CH_2 , C-22), 34.92 (CH, C-20), 32.54 (CH_2 , C-1), 30.59 (CH_2 , C-2, C-23), 28.10 (CH_2 , C-16), 25.53 (CH_3 , C-19), 20.88 (CH_2 , C-15), 20.17 (CH, C-25), 19.07 (CH_3 , C-27), 18.39 (CH_3 , C-21), 12.93 (CH, C-24), 12.75 (CH_3 , C-18), 12.68 (CH_2 , C-26); HMBC correlations (optimized for 8 Hz) H-4/C-2, C-3, C-5, C-10; H-6/C-5, C-8; H-7/C-5, C-8; H-11/C-8, C-10, C-13; H-12/C-9, C-11, C-13, C-14, C-18; H-14/C-7, C-8, C-13, C-18; H-18/C-12, C-13, C-14, C-17; H-19/C-1, C-5, C-9, C-10; H-21/C-17, C-22; H-27/C-24, C-25, C-26; HRDEIMS (M)⁺ m/z observed 412.2971 ($\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$ requires 412.2977); LRMS m/z (relative intensity)

412 (17), 396 (22), 380 (70), 362 (59), 285 (23), 251 (23), 209 (16), 183 (15), 152 (25), 95 (28), 69 (73), 55 (100).

96J-32-B. amorphous white solid; mp 114-115°C; IR (KBr) 3400-3300 (br), 2950, 2860, 1470, 1450, 1380, 1080, 1040, 1020, 680 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.49 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-7), 6.22 (1H, br d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 3.95 (1H, m, H-3), 2.09 (1H, br dd, $J = 13.7, 3.4$ Hz, H-4), 1.96 (1H, m, H-12), 1.93 (1H, m, H-1), 1.91 (1H, m, H-16), 1.89 (1H, dd, $J = 13.7, 13.7$ Hz, H-4), 1.82 (1H, br dd, $J = 12.7, 2.5$ Hz, H-2), 1.67 (1H, ddd, $J = 13.7, 3.4, 2.9$ Hz, H-1), 1.61 (1H, m, H-15), 1.53 (2H, m, H-2, -13), 1.50 - 1.44 (3H, m, H-9, -11, -22), 1.42 - 1.32 (3H, m, H-15, -16, -20), 1.18 (2H, m, H-11, -12), 1.15 (1H, m, H-17), 1.13 (2H, m, H-23), 1.09 (1H, m, H-22), 0.98 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-27), 0.86 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-21), 0.78 (3H, s, H-18), 0.37 (1H, m, H-24), 0.27 (1H, m, H-25), 0.09 (2H, m, H-26); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 135.32 (CH, C-6), 130.71 (CH, C-7), 82.13 (C, C-5), 79.43 (C, C-8), 66.46 (CH, C-3), 56.35 (CH, C-17), 51.57 (CH, C-14), 51.04 (CH, C-9), 44.73 (C, C-13), 39.42 (CH_2 , C-12), 36.95 (CH_2 , C-4), 36.93 (C, C-10), 35.55 (CH_2 , C-22), 34.83 (CH, C-20), 34.70 (CH_2 , C-1), 30.64 (CH_2 , C-23), 30.13 (CH_2 , C-2), 28.26 (CH_2 , C-16), 23.43 (CH_2 , C-11), 20.65 (CH_2 , C-15), 20.22 (CH, C-25), 19.10 (CH_3 , C-27), 18.59 (CH_3 , C-19), 18.20 (CH_3 , C-21), 12.97 (CH, C-24), 12.72 (CH_2 , C-26), 12.65 (CH_3 , C-18); HMBC (optimized for 8 Hz) H-4/C-2, C-3, C-5, C-10; H-6/C-5, C-8, C-10; H-7/C-5, C-8; H-14/C-7, C-8, C-13, C-18; H-15/C-13, C-14; H-18/C-12, C-13, C-14, C-17; H-19/C-1, C-5, C-9, C-10; H-21/C-17, C-22; H-26/C-23, C-24, C-27; H-27/C-24, C-26; HRDEIMS (M^+) m/z observed 414.3133 ($\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ requires 414.3134); LRMS m/z (relative intensity) 414 (22), 398 (29), 382 (22), 362 (13), 267 (12), 219 (13), 173 (19), 152 (67), 135 (23), 107 (27), 95 (42), 69 (70), 44 (100).

96J-32-C. white amorphous solid; ^1H NMR (CDCl_3 , key protons only) δ 6.48 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-7), 3.95 (1H, m, H-3), 2.09 (1H, br dd, $J = 13.8, 3.9$ Hz, H-4), 0.86 (3H, s, H-19), 0.78 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-21), 0.82 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-29), 0.80 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (CDCl_3 , numbers in parenthesis are chemical shifts of the minor diastereomer) δ 135.34 (CH, C-6), 130.72 (CH, C-7), 82.13 (C, C-5), 79.44 (C, C-8), 66.47 (CH, C-3), 56.31 (56.33, CH, C-17), 51.59 (CH, C-14), 51.07 (CH, C-9), 45.81 (46.03, CH, C-24), 44.75 (C, C-13), 39.44 (CH_2 , C-12), 36.97 (C, C-10), 36.95 (CH_2 , C-4), 35.62 (35.74, CH, C-20), 34.72 (CH_2 , C-1), 33.75 (33.72, CH_2 , C-22), 30.15 (CH_2 , C-2), 29.17 (28.96, CH, C-25), 28.29 (CH_2 , C-16), 26.10 (26.39, CH_2 , C-28), 23.44 (CH_2 , C-11), 23.08

(23.02, CH₂, C-23), 20.67 (CH₂, C-15), 19.85 (19.62, CH₃, C-26), 19.06 (18.99, CH₃, C-27), 18.67 (18.72, CH₃, C-19), 18.20 (CH₃, C-21), 12.66 (CH₃, C-18), 12.00 (12.35, CH₃, C-29): HRDCIMS (M+H)⁺ *m/z* observed 445.3610 (C₂₉H₄₉O₃ requires 445.3681): LRMS *m/z* (relative intensity) 462 (M+NH₄, 7), 445 (36), 429 (93), 427 (100), 411 (84), 409 (43), 393 (88), 161 (11), 152 (11), 109 (13).

96J-32-D. white amorphous solid: ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.50 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-7), 6.24 (1H, br d, *J* = 8.3 Hz, H-6), 5.19 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, H-23), 5.13 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, H-22), 3.97 (1H, m, H-3), 2.11 (1H, ddd, *J* = 13.7, 4.9, 2.0 Hz, H-4), 2.01 (1H, m, H-20), 1.97 (1H, m, H-12), 1.95 (1H, m, H-1), 1.92 (1H, m, H-16), 1.91 (1H, dd, *J* = 13.7, 11.7 Hz, H-4), 1.84 (2H, m, H-2, -24), 1.75 (1H, m, H-15), 1.69 (1H, ddd, *J* = 13.7, 3.4, 3.4 Hz, H-1), 1.56 (2H, m, H-2, -14), 1.51-1.42 (3H, m, H-9, -11, -25), 1.40 (1H, m, H-15), 1.37 (1H, m, H-16), 1.26-1.19 (3H, m, H-11, -12, -17), 0.98 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.81 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-27), 0.81 (3H, s, H-18): ¹³C NMR (CDCl₃) δ 135.40 (CH, C-6/-23), 135.39 (CH, C-6/-23), 132.39 (CH, C-22), 130.73 (CH, C-7), 82.14 (C, C-5), 79.41 (C, C-8), 66.45 (CH, C-3), 56.13 (CH, C-17), 51.68 (CH, C-17), 51.06 (CH, C-9), 44.54 (C, C-13), 43.05 (CH, C-24), 39.80 (CH, C-20), 39.32 (CH₂, C-12), 36.95 (C, C-10), 36.91 (CH₂, C-4), 34.67 (CH₂, C-1), 33.18 (CH₂, C-25), 30.11 (CH₂, C-2), 28.90 (CH₂, C-16), 23.39 (CH₂, C-11), 20.90 (CH₃, C-21), 20.66 (CH₂, C-15), 20.15 (CH₃, C-26), 19.64 (CH₃, C-27), 18.17 (CH₃, C-19), 18.02 (CH₃, C-28), 12.83 (CH₃, C-18): HRDCIMS (M+H)⁺ *m/z* observed 429.3358 (C₂₈H₄₅O₃ requires 429.3369): LRMS *m/z* (relative intensity) 446 (M+NH₄, 18), 429 (64), 413 (71), 395 (64), 377 (100), 125 (12), 109 (10).

96J-32-E. white amorphous solid: ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.50 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-6), 3.97 (1H, m, H-3), 2.10 (1H, ddd, *J* = 13.7, 4.9, 2.0 Hz, H-4), 1.96 (1H, m, H-12), 1.93 (1H, m, H-1), 1.91 (1H, m, H-16), 1.91 (1H, dd, *J* = 13.7, 11.7 Hz, H-4), 1.83 (1H, m, H-2), 1.69 (1H, ddd, *J* = 13.7, 3.9, 3.4 Hz, H-1), 1.61 (2H, m, H-14, -15), 1.57-1.53 (2H, m, H-2, -25), 1.51-1.47 (2H, m, H-9, -11), 1.42 (1H, m, H-15), 1.40-1.31 (6H, m, H-16, -20, -22, -23, -24, -24), 1.22 (1H, m, H-11), 1.18 (1H, m, H-12), 1.15-1.10 (2H, m, H-17, -23), 0.98 (1H, m, H-22), 0.90 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.88 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.86 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-27), 0.79 (3H, s, H-18): ¹³C NMR (CDCl₃) δ 135.37 (CH, C-6), 130.75 (CH, C-7), 82.14 (C, C-5), 79.45 (C, C-8), 66.46 (CH, C-3), 56.40 (CH, C-17), 51.56 (CH, C-14), 51.04 (CH, C-9), 44.72 (C, C-13), 39.41 (CH₂, C-12, C-24), 36.93 (CH₂, C-4), 36.91 (C,

C-10), 35.93 (CH₂, C-22), 35.21 (CH, C-20), 34.68 (CH₂, C-1), 30.10 (CH₂, C-2), 28.23 (CH₂, C-16), 27.97 (CH, C-25), 23.78 (CH₂, C-23), 23.40 (CH₂, C-11), 22.80 (CH₃, C-26), 22.53 (CH₃, C-27), 20.60 (CH₂, C-15), 18.56 (CH₃, C-21), 18.16 (CH₃, C-19), 12.61 (CH₃, C-18): HRDCIMS (M+H)⁺ *m/z* observed 417.3354 (C₂₇H₄₅O₃ requires 417.3369); LRMS *m/z* (relative intensity) 434 (M+NH₄⁺, 17), 417 (54), 411 (16), 401 (88), 399 (100), 391 (11), 383 (57), 365 (100).

96J-32-F, white amorphous solid: ¹H NMR (CDCl₃, key protons) δ 5.35 (1H, t, *J* = 2.7 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 2.29 (1H, br ddd, *J* = 12.7, 4.9, 2.0 Hz, H-4), 2.23 (1H, m, H-4), 1.99 (1H, m, H-6), 1.96 (1H, m, H-1), 1.84 (2H, m, H-2, -6), 1.12 (2H, m, H-23), 1.07 (1H, m, H-22), 1.01 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, *J* = 5.8 Hz, H-27), 0.88 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-21), 0.69 (3H, s, H-18), 0.39 (1H, m, H-25), 0.29 (1H, m, H-24), 0.10 (2H, m, H-26): ¹³C NMR (CDCl₃, minor in parenthesis) δ 140.74 (C, C-5), 121.71 (CH, C-6), 71.80 (CH, C-3), 56.75 (CH, C-14), 56.07 (CH, C-17), 50.11 (CH, C-9), 42.30 (C, C-13), 42.29 (CH₂, C-4), 39.75 (CH₂, C-12), 37.24 (CH₂, C-1), 36.49 (C, C-10), 36.44 (CH₂, C-22), 35.37 (CH, C-20), 31.90 (CH, C-8), 31.89 (CH₂, C-7), 31.65 (CH₂, C-2), 30.65 (CH₂, C-23), 28.20 (CH₂, C-16), 24.28 (CH₂, C-15), 21.07 (CH, C-24), 19.39 (CH₃, C-19), 19.08 (CH₃, C-21), 18.69 (CH₃, C-27), 12.90 (CH, C-25), 12.68 (CH₂, C-26), 11.84 (CH₃, C-18): HRDEIMS (M)⁺ *m/z* observed 384.3386 (C₂₇H₄₄O requires 384.3392); LRMS *m/z* (relative intensity) 384 (44), 369 (19), 351 (18), 314 (20), 299 (23), 271 (100), 213 (14), 161 (8), 145 (8).

File:7179515B Ident:27 Mer Def 0.25 Acq:17-JUL-1995 13:57:35 +1:23 Cal:7179501B_1
70S EI+ Magnet BpM:55 BpI:2738911 TIC:71551312 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) 94K-31-1 DEI

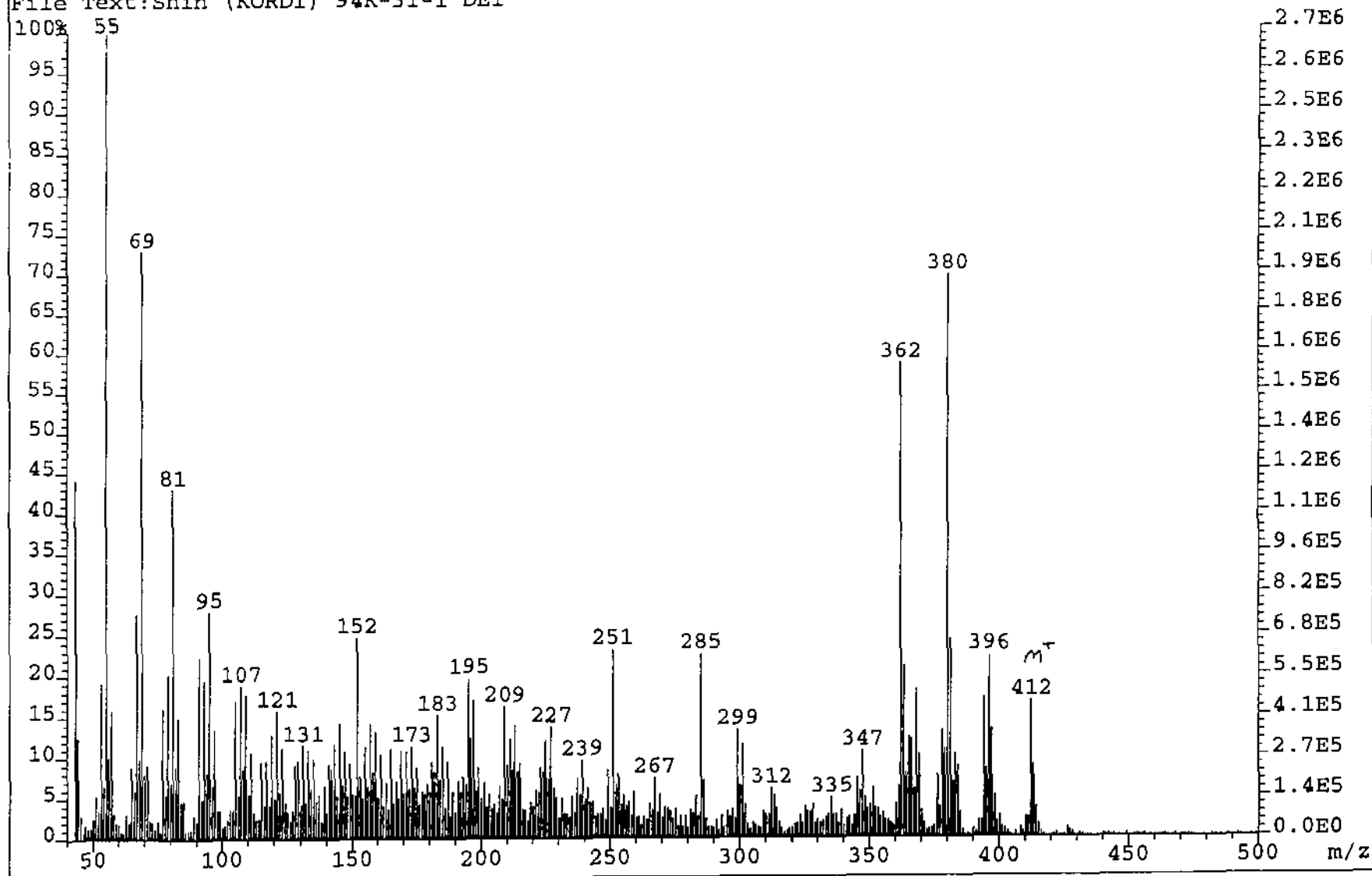


Fig. 3-69. HRMS spectrum of compound 96J-32-A.

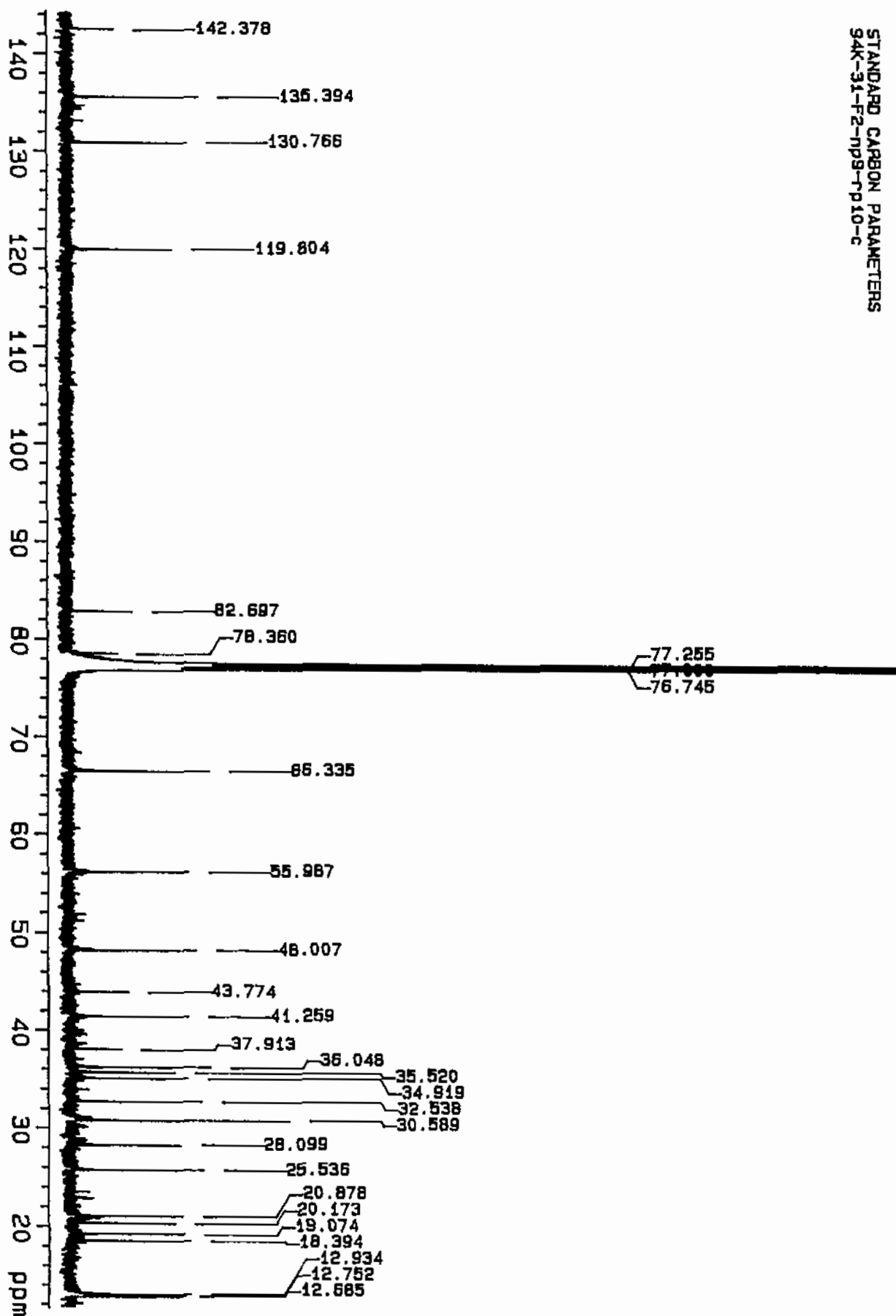


Fig. 3-70. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-A.

94K-31-F2-np9-rp10-p

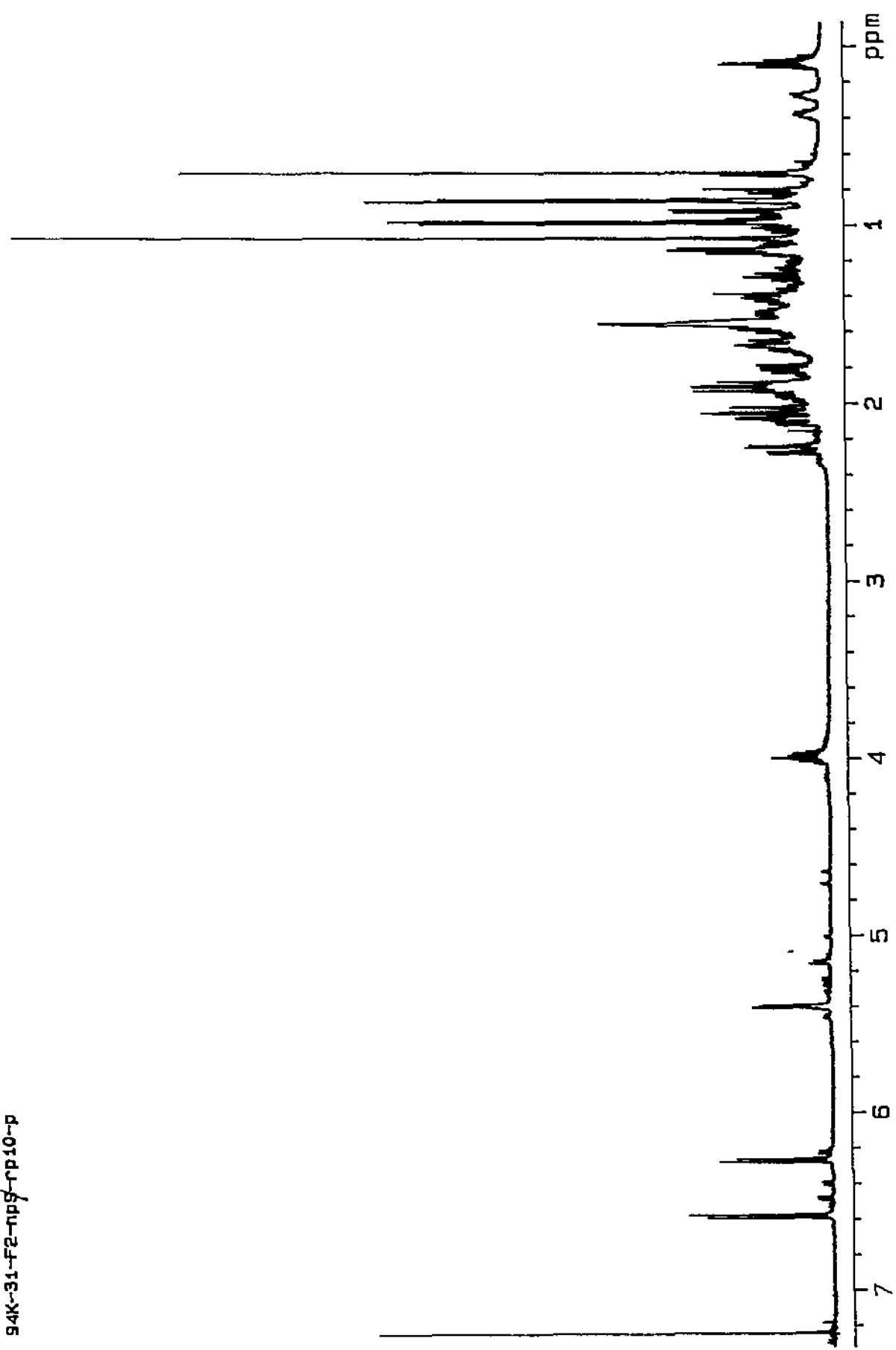


Fig. 3-71. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-A.

94K-31-A-COSY

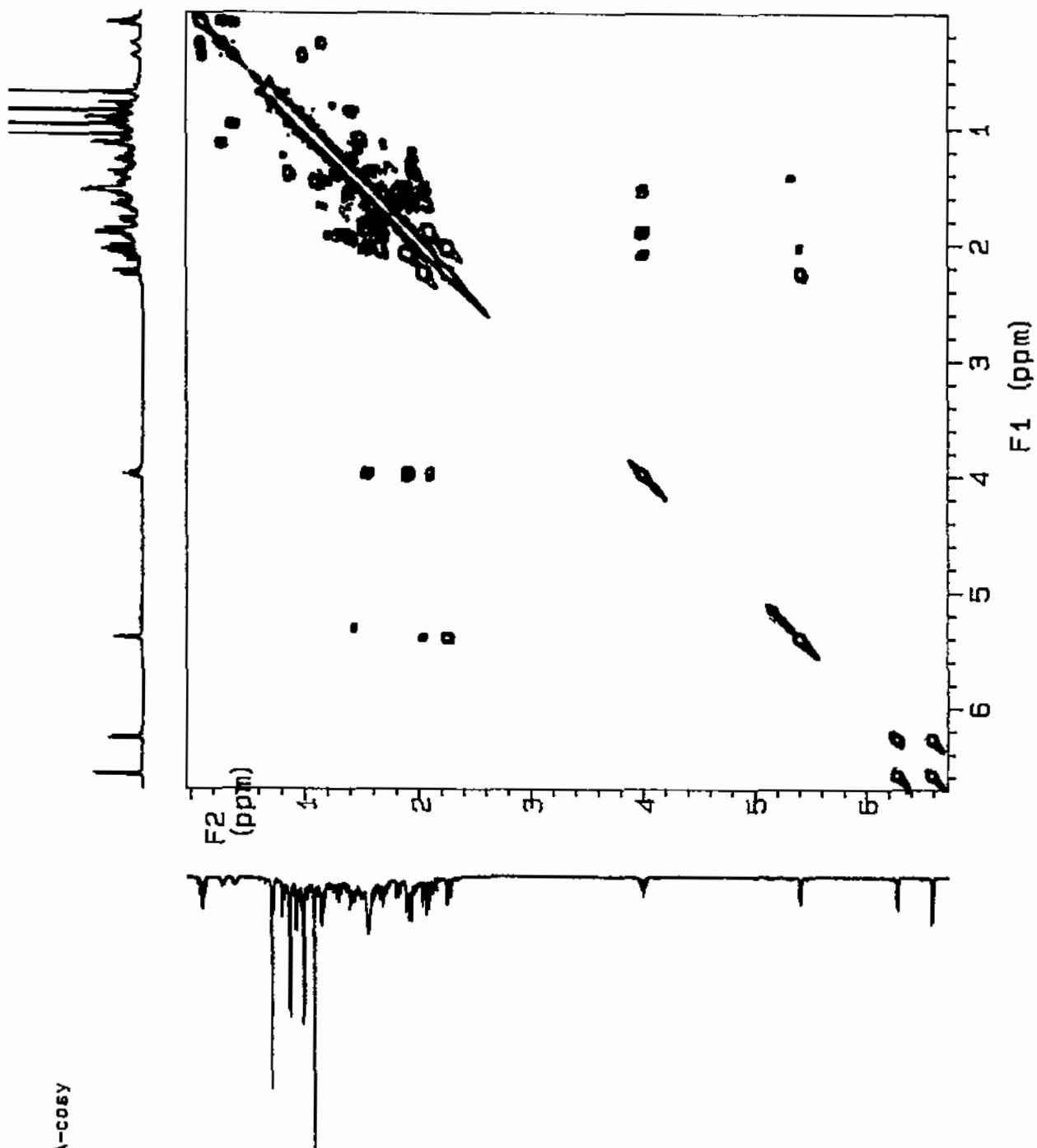


Fig. 3-72. Proton COSY spectrum of compound 96J-32-A.

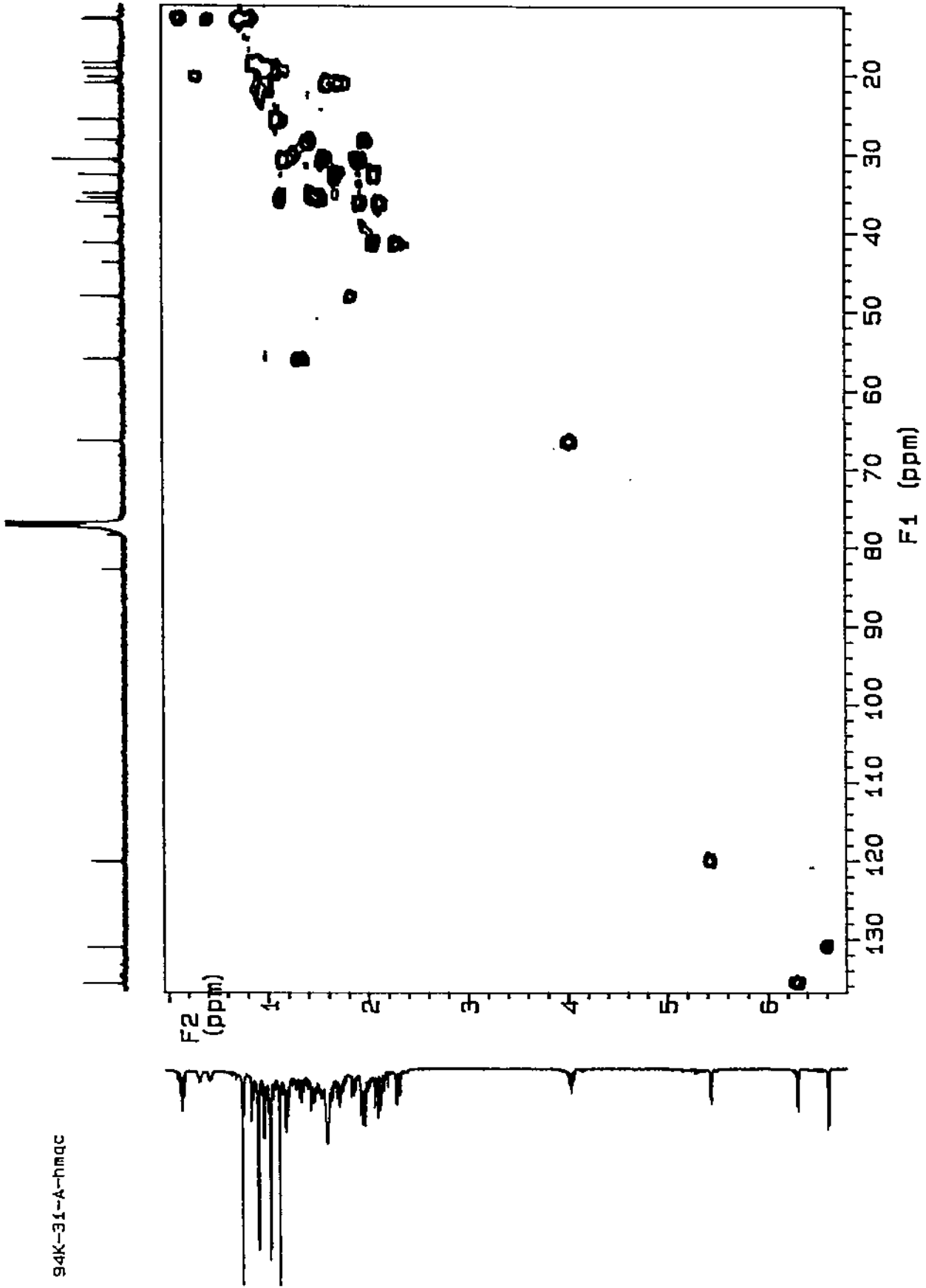


Fig. 3-73. HMQC spectrum of compound **96J-32-A**.

File:7179517B Ident:26 Mer Def 0.25 Acq:17-JUL-1995 14:38:59 +1:19 Cal:7179501B_1
70S EI+ Magnet BpM:44 BpI:388780 TIC:13125116 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) 94K-31-2 DEY

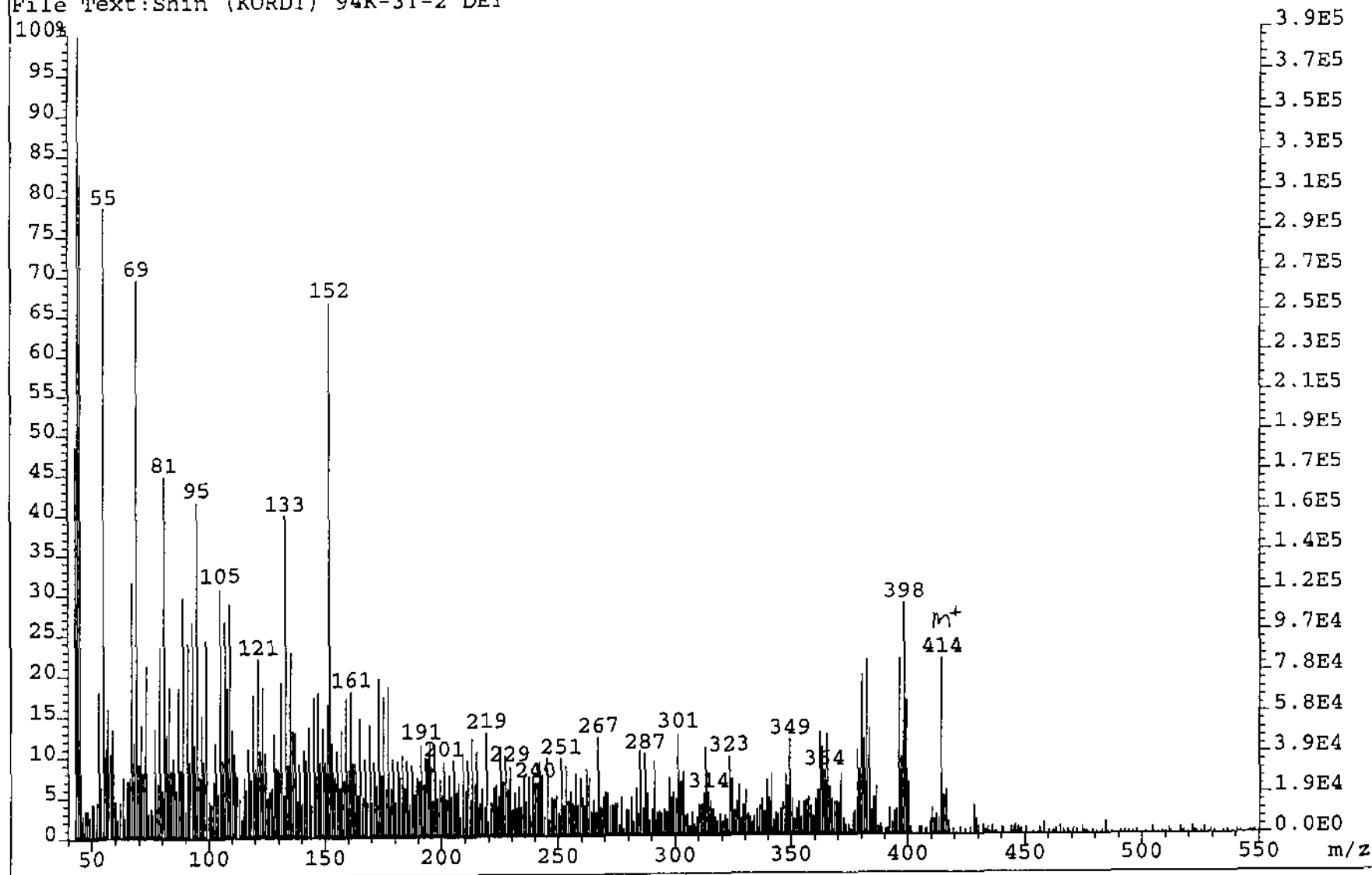


Fig. 3-75. HRMS spectrum of compound 96J-32-B.

94K-31-F2-nd9-rp13-p

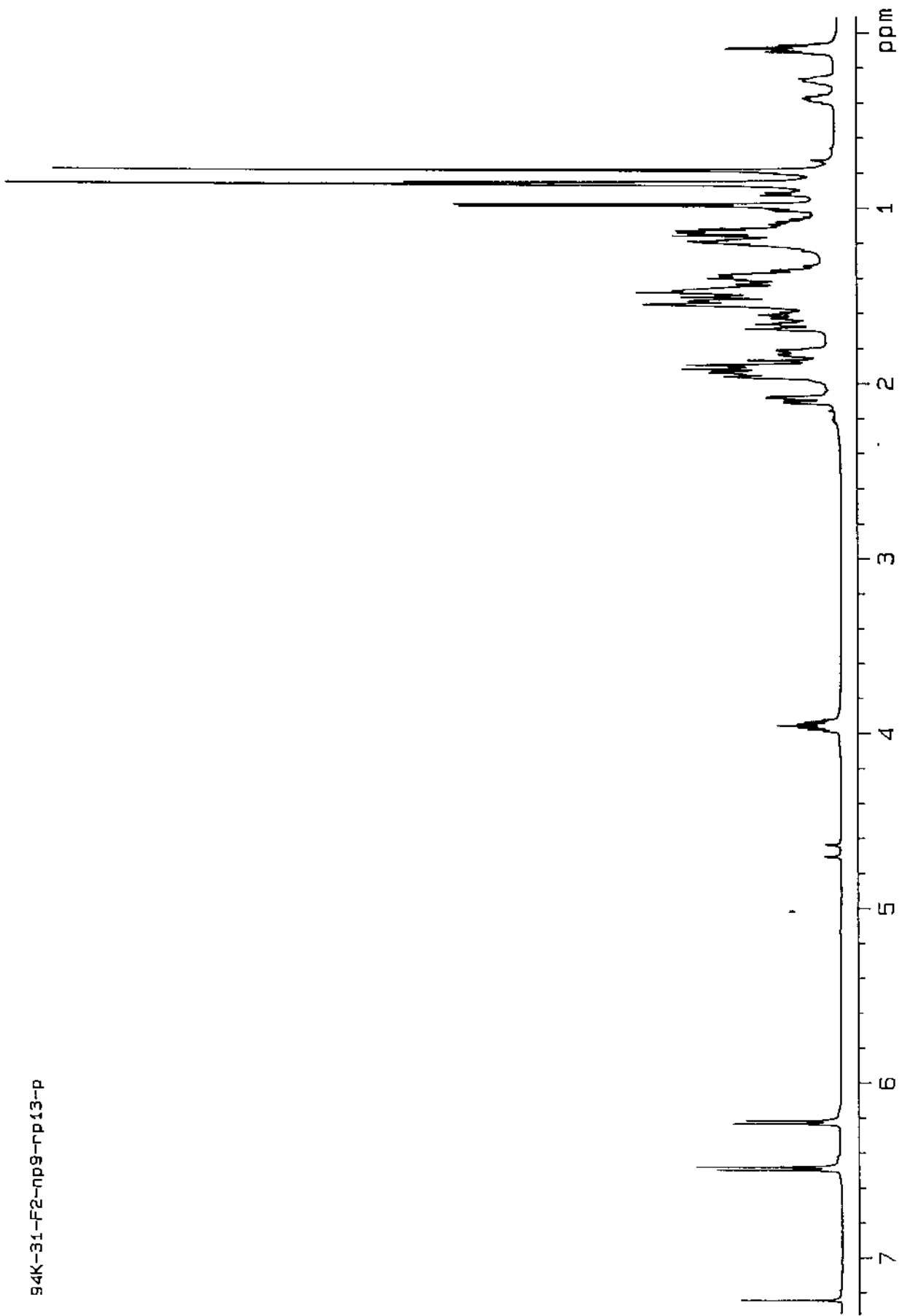
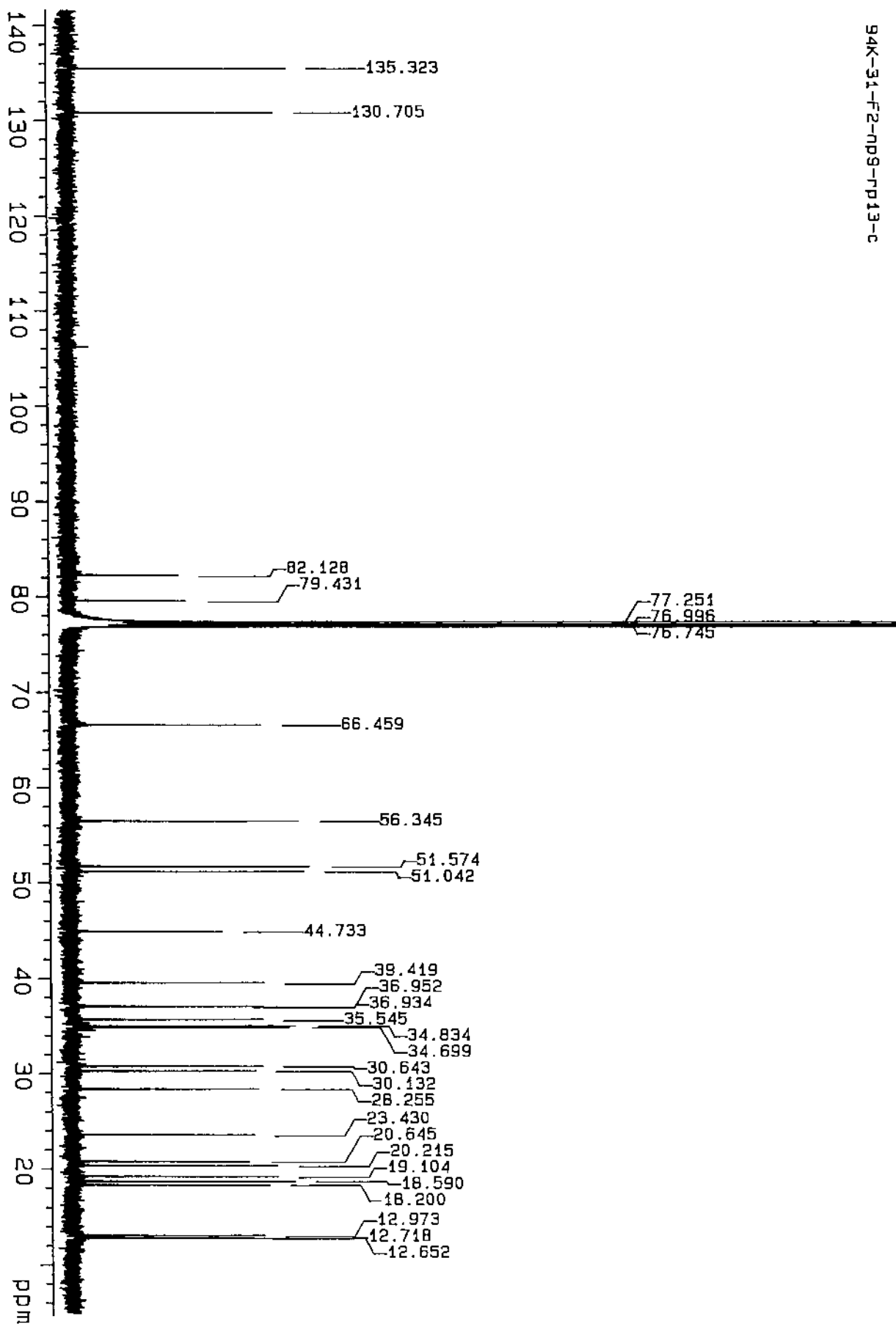


Fig. 3-76. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-B.

Fig. 3-77. Carbon NMR spectrum of compound **96J-32-B**.

File:2029604B Ident:16 Mer Def 0.25 Acq: 2-FEB-1996 09:09:49 +1:05 Cal:2029601B_1
70S CI+ Magnet BpM:427 BpI:1459915 TIC:34092444 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) Unk.# 94K-31-F DCI (NH3)

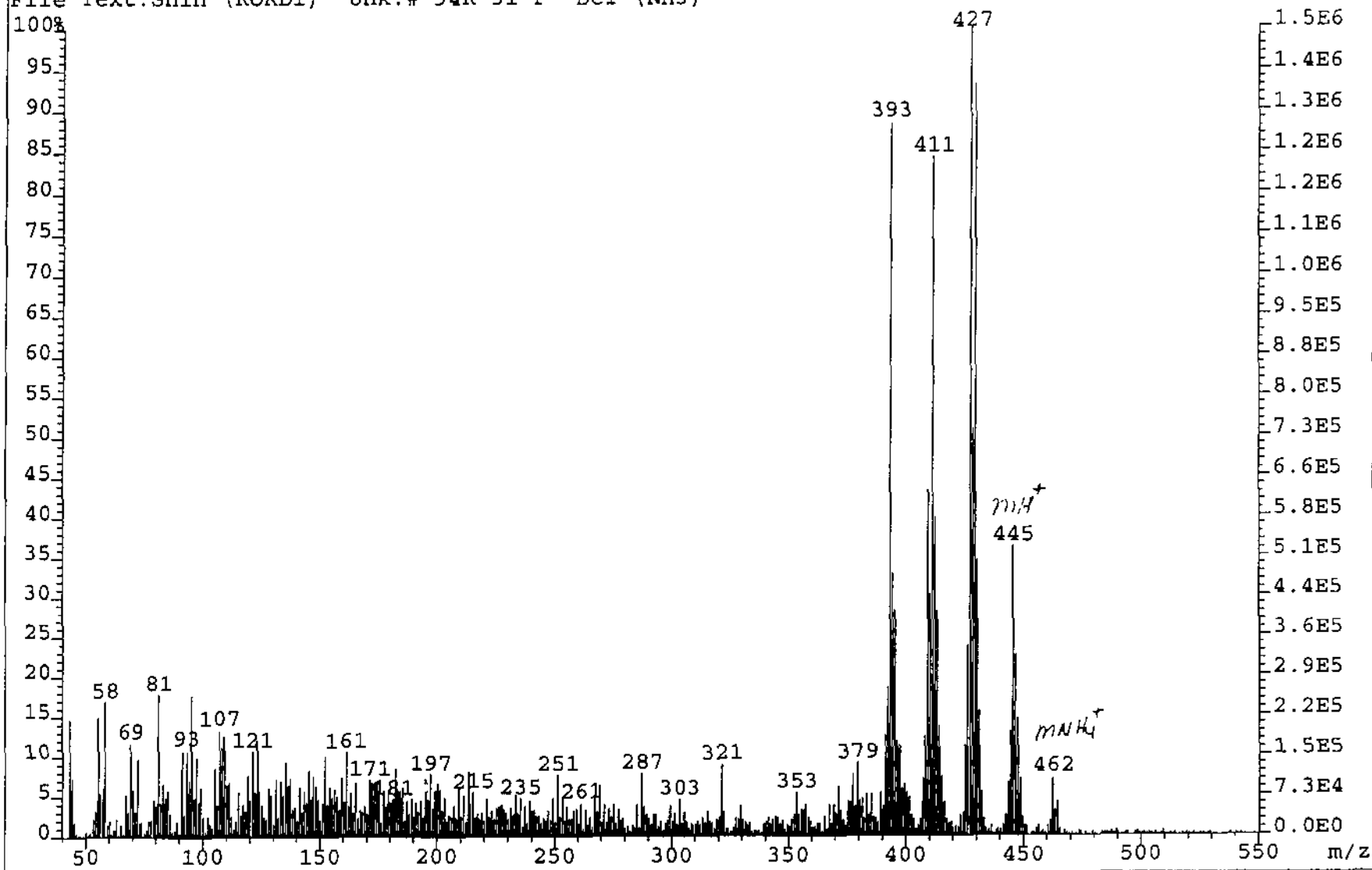


Fig. 3-78. HRMS spectrum of compound 96J-32-C.

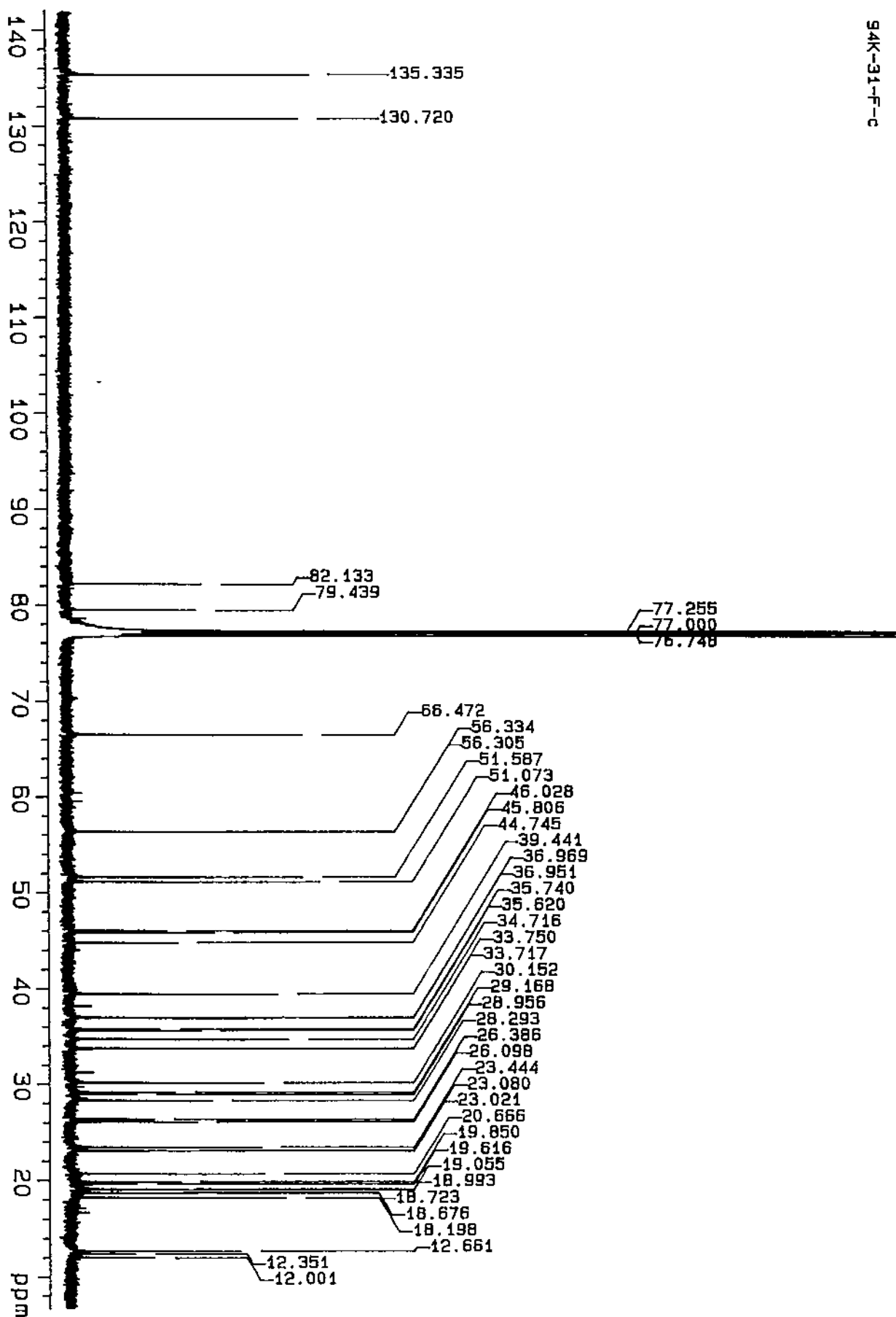


Fig. 3-79. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-C.

94K-31-f-p

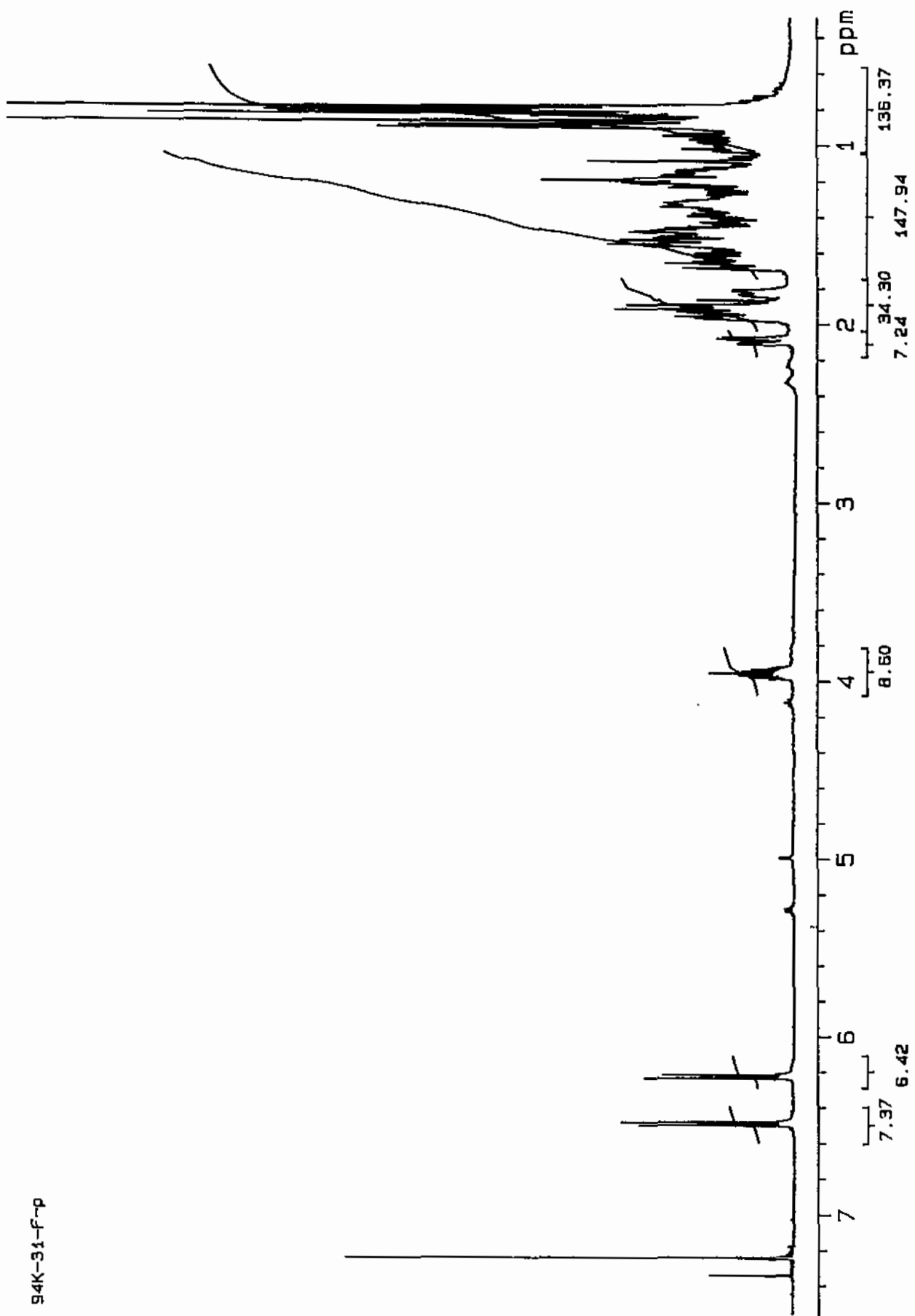


Fig. 3-80. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-C.

File:2019614B Ident:8 Mer Def 0.25 Acq: 1-FEB-1996 15:21:40 +0:34 Cal:2019601B_1
70S CI+ Magnet BpM:377 BpI:4036713 TIC:57704036 Flags:NORM
File Text:Shin (KORDI) 94K-31-D DCI (NH3)

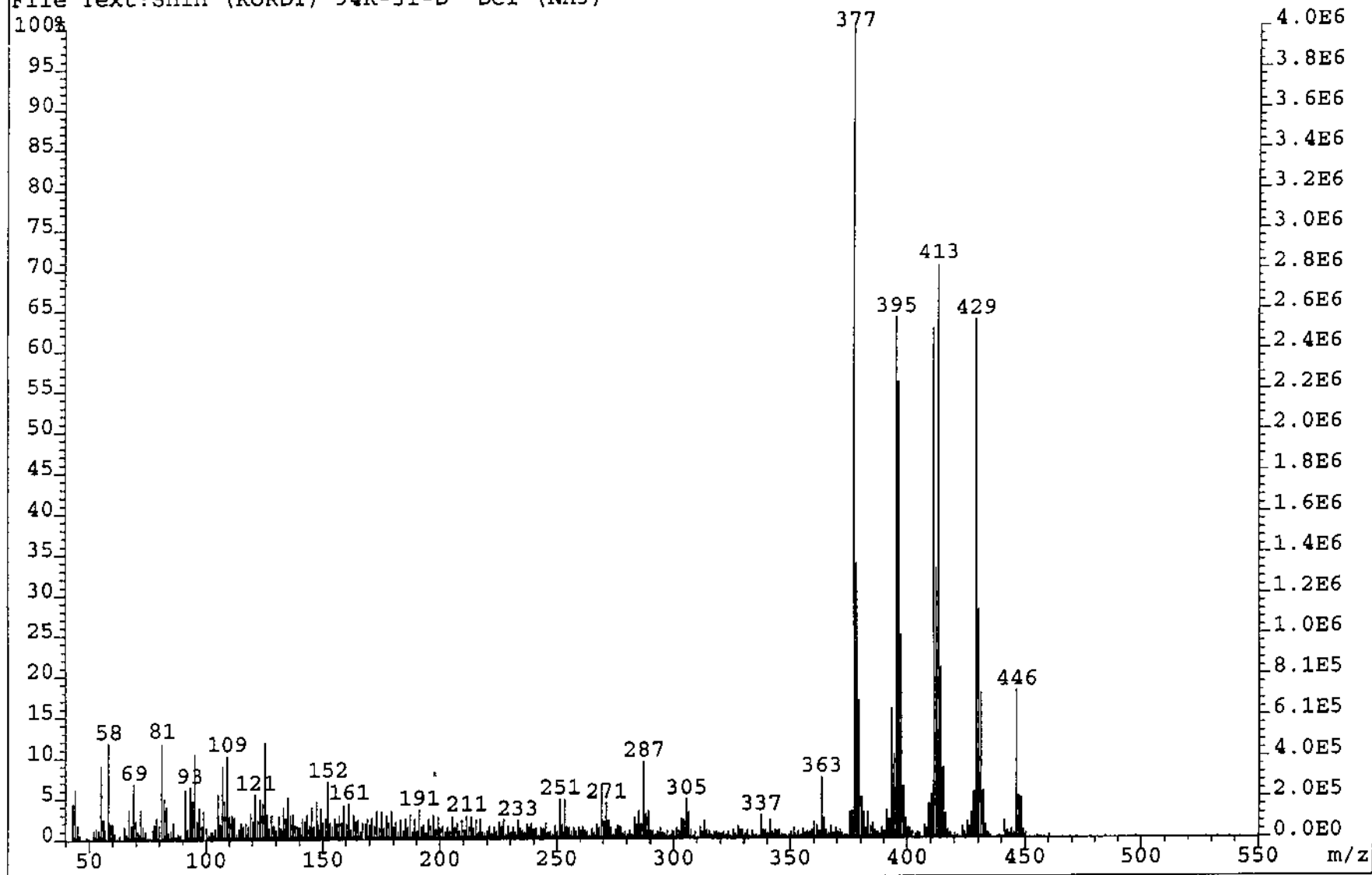


Fig. 3-81. HRMS spectrum of compound 96J-32-D.

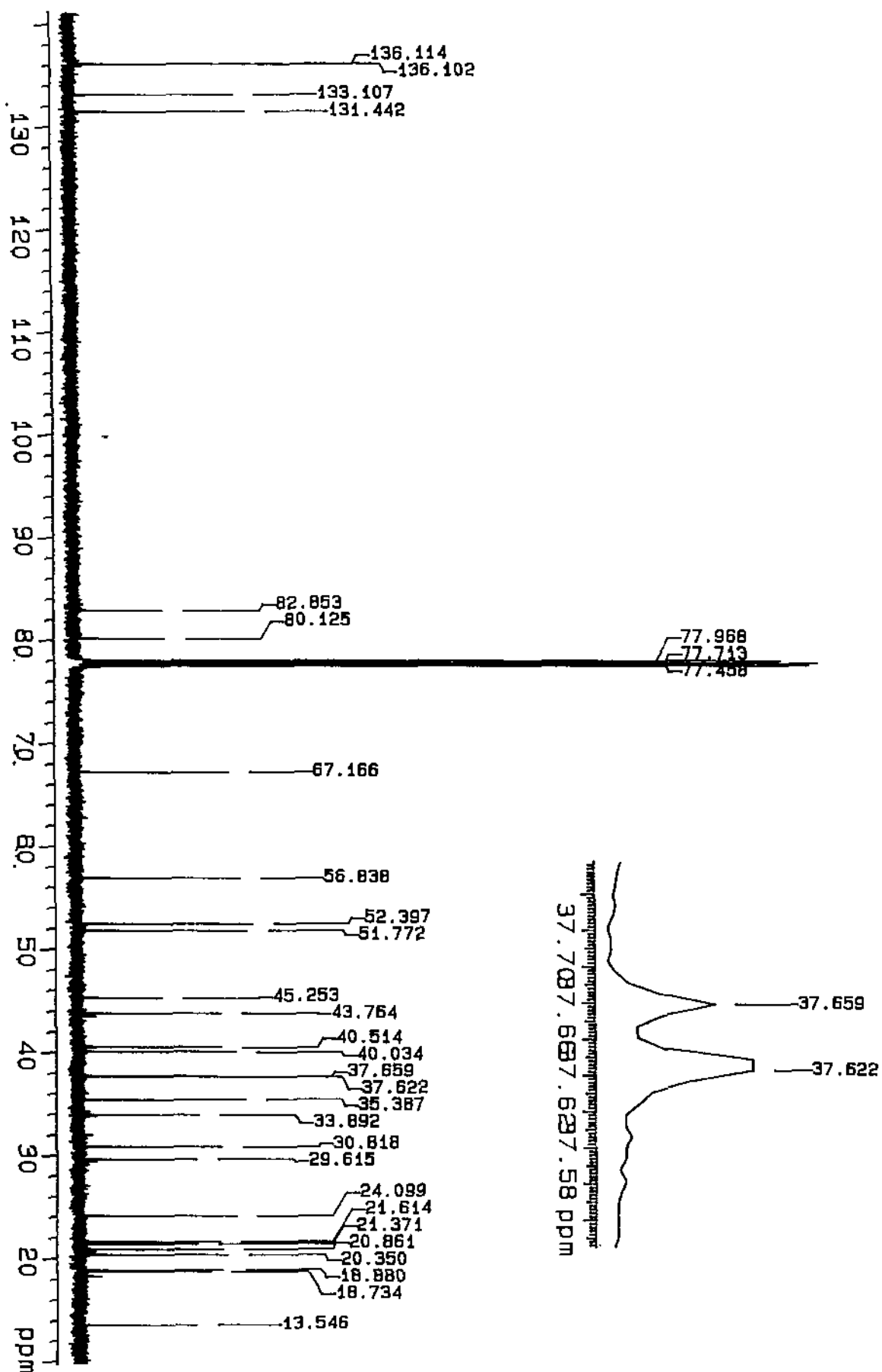


Fig. 3-82. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-D.

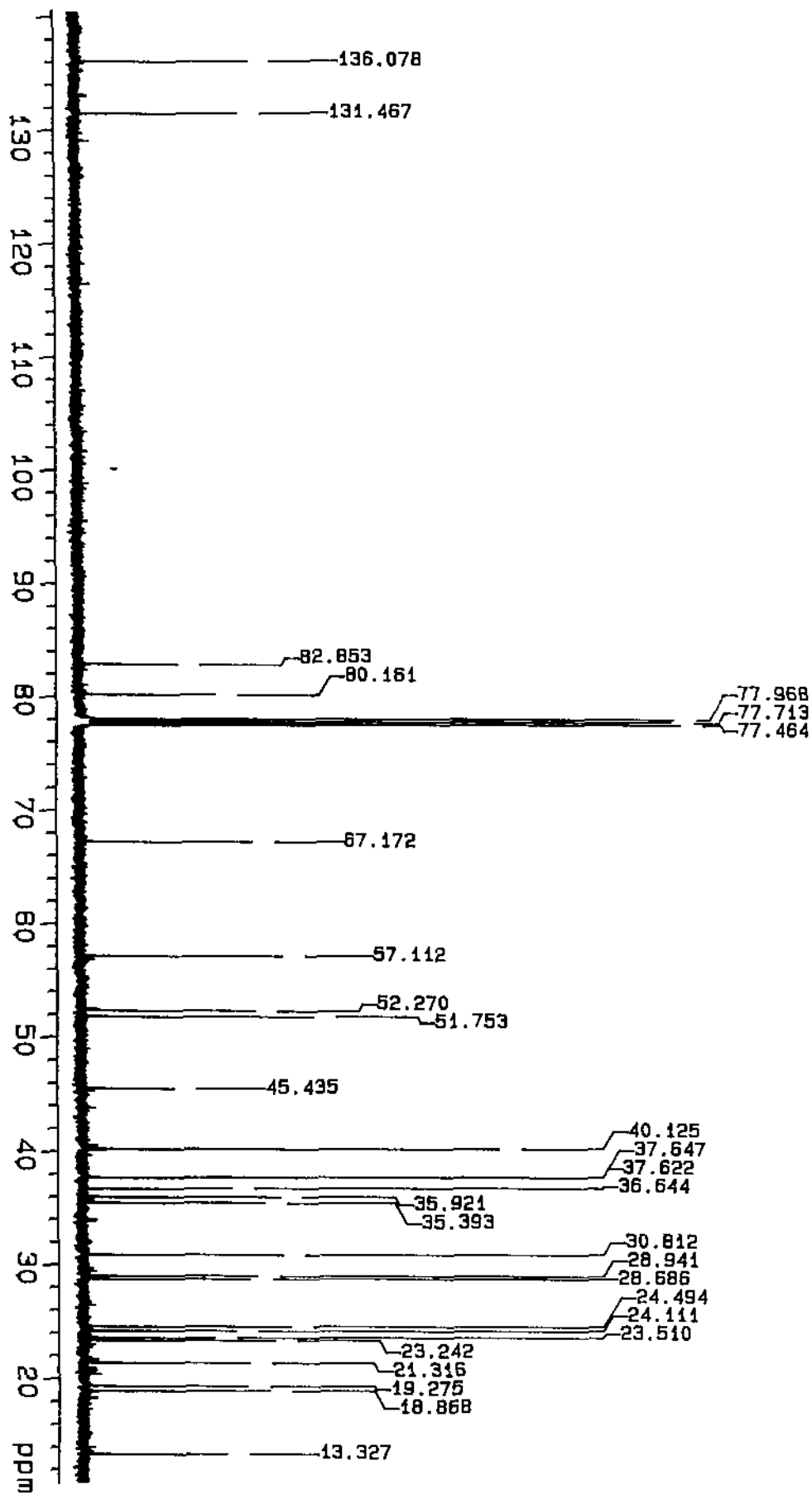


Fig. 3-84. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-E.

94K-31-E

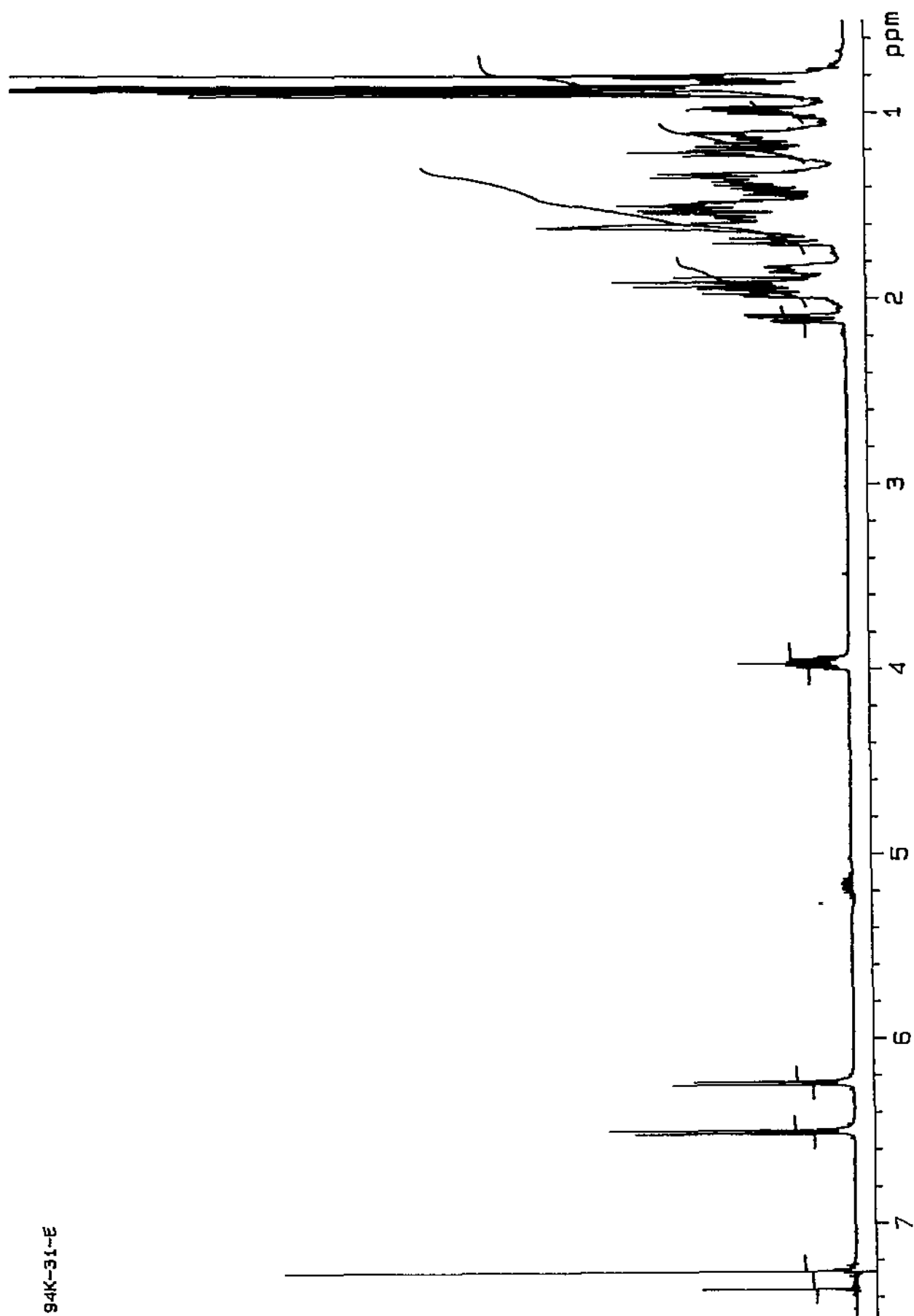


Fig. 3-85. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-E.

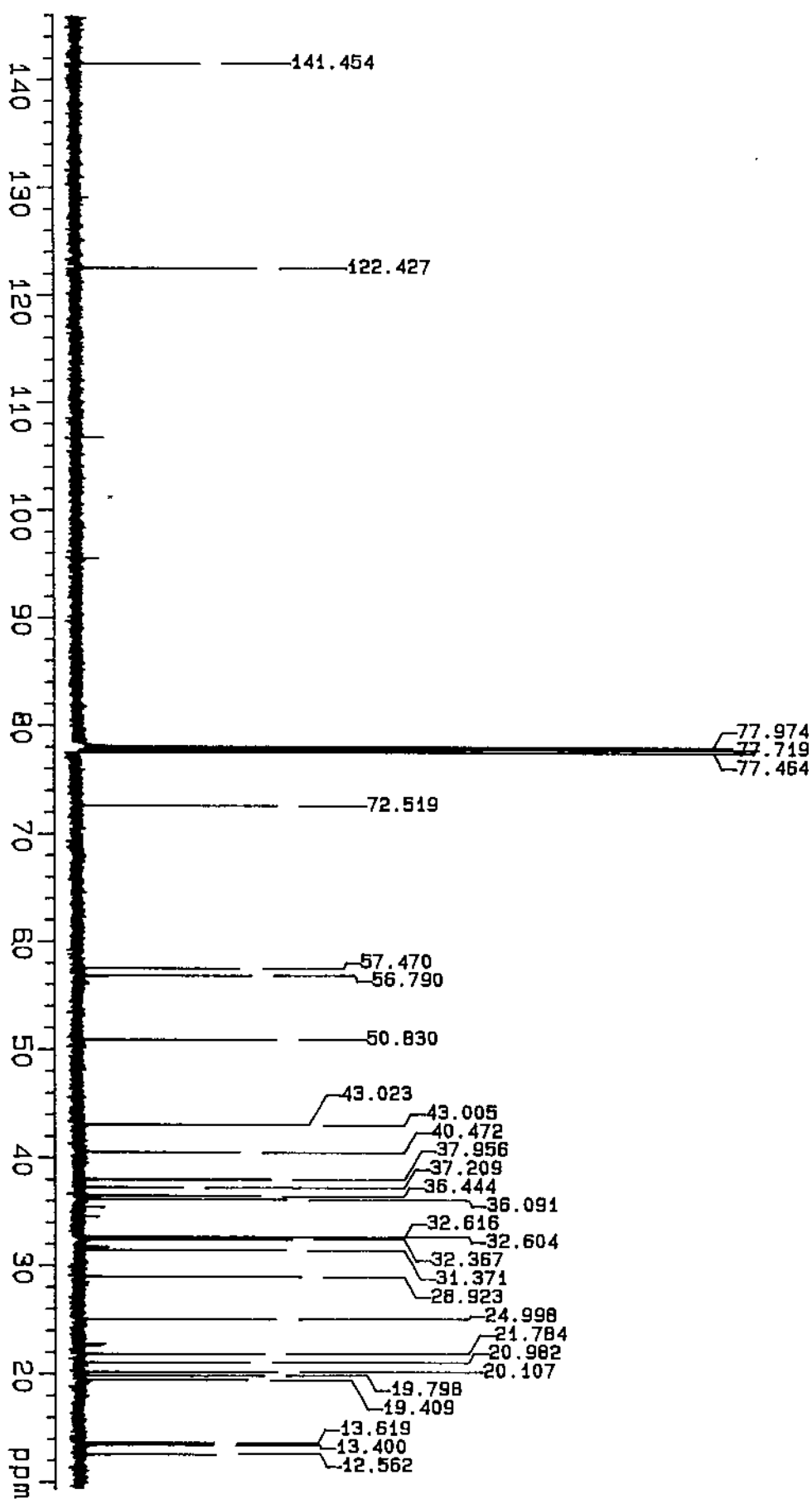


Fig. 3-86. Carbon NMR spectrum of compound 96J-32-F.

94K-31-C

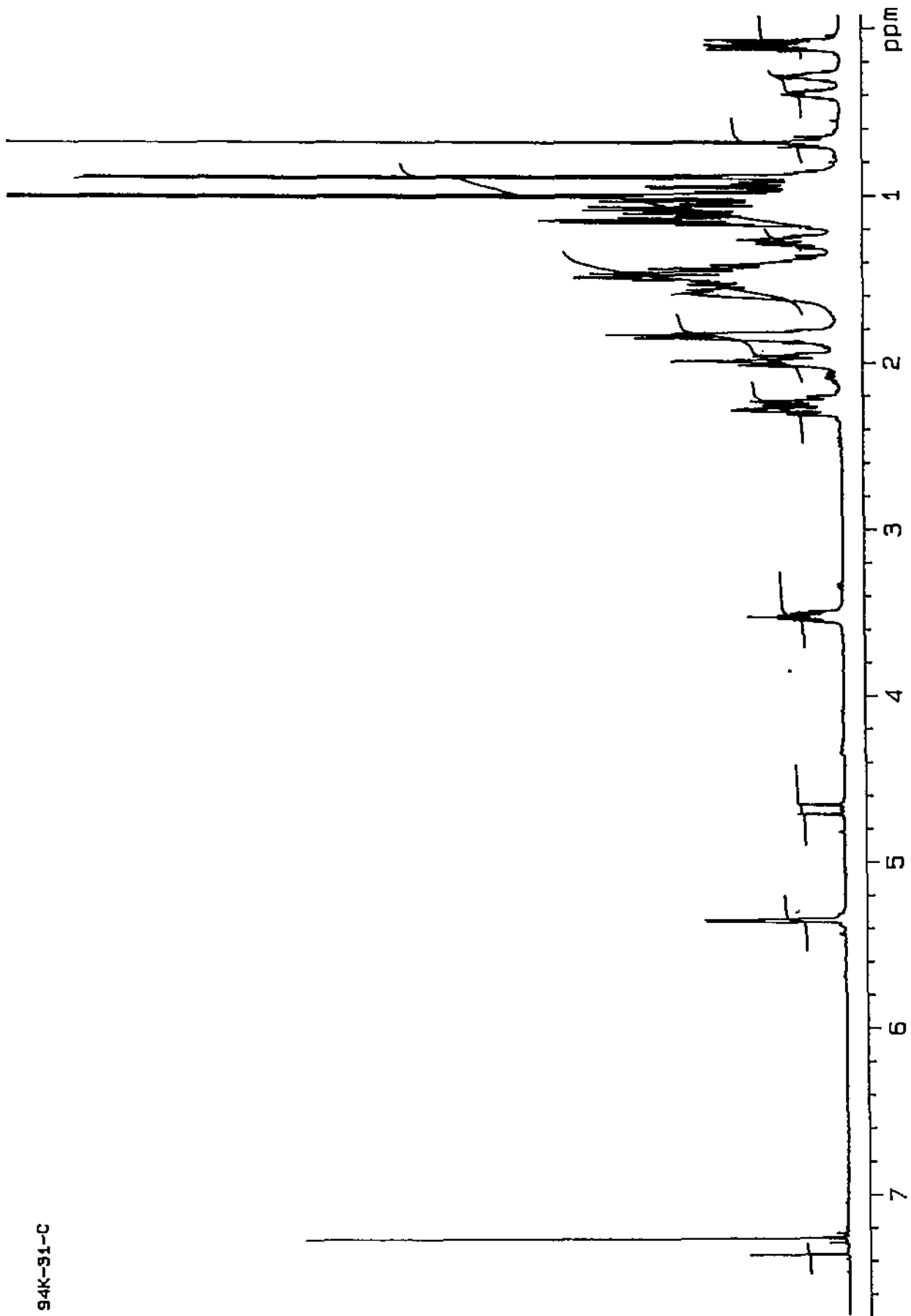


Fig. 3-87. Proton NMR spectrum of compound 96J-32-F.

제 4 절 해면 *Spongosorites genitrix*의 대사물질

1. 서론

해면시료 95J-35는 1995년 11월 하순 제주도 서귀포 연안의 문섬 주변의 수심 20-30 m 지역에서 SCUBA diving으로 채집되었다. 무정형 덩이로 이루어진 이 해면은 외면은 짙은 갈색, 내면은 연한 황색을 띄고 있었으며 특징적인 점은 절단면이 공기에 노출될 경우 수 분 이내에 내부의 색깔이 황색으로부터 대단히 짙은 갈색 내지는 검은 색으로 변한다는 점이다. 이 시료는 형태적으로 특이할 뿐만 아니라 조추출물의 brine-shrimp 독성(LC₅₀ 21 ppm)이 우수하여 연구대상으로 선정하였다. 이 시료의 생물학적 동정을 국내의 전문가에게 의뢰한 결과 *Topsentia genitrix*로 일반적으로 불리는 종으로 분류되었다. 그러나 이 명칭은 1920년대에 주로 통용되었던 것으로서 현재에는 *Topsentia*속과 *Spongosorites*속에 대한 재분류가 진행되고 있으나 분류학자들 간에 절대다수의 공감을 얻는 기준이 설정된 것은 아니다. 그러나 본 연구에서 선택된 시료 95J-35에 대해서는 일반적인 형태학적 특징과 미세표면의 모양 및 조직내 분포로 보아 *Spongosorites genitrix* (family Halichondriidae)로 정의하는 것이 타당하다는 전문가의 결론이 내려졌다(심정자, personal commun.: Shin, et al., 1998). 또한 본 연구진에서 예전에 채집한 시료의 형태적인 특징과 조추출물의 TLC 분석 자료를 종합한 결과 1992년 7월에 동일한 지역에서 채집하였던 시료(시료번호 92J-2)와 동일한 것이 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 두 가지 시료를 합하여 화학적 분석과 천연물 연구를 하였다.

문헌조사 결과 *Topsentia*속과 *Spongosorites*속의 대표적인 천연물은 bis(indole) 계열의 alkaloids로 밝혀졌다. 1987년에 *Topsentia genitrix*로부터 bis(indolyl)imidazole인 topsentin과 그 유도체들이 발견된 이후 이 계열에 속하는 천연물들이 해면동물로부터 지속적으로 보고되어 있으며 현재까지 bis(indole)기를 가진 해면유래 천연물의 수는 50을 상회하고 있다 (Faulkner, 1997; Bartik, et al., 1987; Tsujii et al., 1988; Braekman, et al., 1987; 1989; Morris & Andersen, 1989; 1990; Sakemi & Sun, 1991; Murray, et al., 1995). 주된 생합성적 기원을 tryptophan에 갖고 있는 이들은 세포독성, 항암, 항바이러스, 소염, adrenergic receptor에 대한 선택적 결합 등 다양한 생리활성을 나타내어 생의약학 적으로 큰 주목을 받고 있으며 해면의 천연물 중에서 대표적인 부류의 하나로 널리 인식되고 있다 (McConnell, et al., 1990; 1994; Phife, et al., 1996; Faulkner, 1997). 더욱이 topsentins 및 이들과 구조적으로 유사한 nortopsentins는 화학적 구조가 비교적 단순하여 유기반응에 의한 대량생산이 용이하므로 유기합성적 전합성이나 천연물의 구조변환에 의한 활성효과가 없거나 미미한 천연물로부터- 신규 생리활성물질의 창출

등 의약품 개발에서도 중요하게 취급되고 있다(Mancini, et al, 1996; Kawasaki, et al, 1994; 1996).

냉동보관 중인 시료 95J-35(92J-2와 혼합)를 감압하에서 건조하여 수분을 제거한 후 MeOH와 CH₂Cl₂로 반복하여 유기물질을 추출하였다. 이렇게 얻어진 조추출물을 물과 BuOH로 분획하여 염과 기타의 극성 일차대사물질을 제거한 후 BuOH층을 극성에 따라 hexane과 aq. MeOH로 다시 분배하였다. Brine-shrimp 유생에 대하여 강한 독성(LC₅₀ 14.7 ppm)을 나타낸 aq. MeOH 층에 대하여 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography를 한 후 각각의 분획에 대한 ¹H NMR spectrum 검증의 결과 유의한 분획에 대하여 다시 silica 및 reversed-phase HPLC를 반복하여 4 종의 천연물을 분리하였다(Fig. 3-88). 분광자료 해석과 문헌비교에 의하여 이들의 구조를 결정한 바 이들은 2 종의 알려진 물질과 2 종의 신물질이었다. 이들은 모두 혈액암 세포인 K562에 대하여 강한 독성을 나타내었다.

2. Bis(indole)imidazoles의 분리, 구조결정 및 생리활성

질은 황색의 무정형 고체로 분리된 물질 95J-35-A의 분자식은 HREIMS 분석에 의하여 C₂₀H₁₄N₄O로 결정되었다(Fig. 3-89). 그러나 MeOH-d₄ 용액에서 획득한 이 물질의 ¹H와 ¹³C NMR spectra는 모두가 대단히 복잡하여 ¹H NMR data 에서는 28 개의 수소원자에 해당하는 signals가 aromatic region과 >10 ppm에 복잡하게 중첩되어 있었다(Fig. 3-90). 또한 ¹³C NMR spectrum에서도 39 개의 signals이 downfield region에 나타나 있었다(Fig. 3-91). 이러한 현상은 pyridine-d₆, DMSO-d₆, acetone-d₆, THF-d₆ 등 여러 NMR 용매에서도 동일하게 관찰되었다. 그러므로 물질 95J-35-A는 두 종류의 유사한 물질의 혼합체이거나 서로 빠른 속도로 변화하는 tautomers로 생각되었다. 후자의 가능성을 확인하기 위하여 DMSO-d₆에 약 1%의 TFA(trifluoroacetic acid)를 혼합한 용액 하에서 NMR data를 측정할 결과 전기한 현상이 모두 사라졌으며 구조의 해석도 용이하게 되었다. 따라서 95J-35-A는 서로 대단히 빠른 속도로 교환하는 tautomeric compound로 결론 지워졌다.

물질 95J-35-A의 NMR data에서는 upfield region에 수소나 탄소의 signals가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 3-92 and 3-93). 이러한 사실은 이 천연물이 benzene, pyridine, indole, imidazole, acridine, creatine, oxazole, oxazoline 등 방향성 고리나 이와 유사한 heterocycles로 주로 구성되어 있음을 의미하였다. 이를 지지하는 중요한 증거는 ¹H NMR spectrum에서 D₂O와의 교환이 가능한 두 개의 수소 signals가 downfield region에서 발견된 사실이다: δ 12.50(1H, d, J = 2.3 Hz), 11.64(1H, d, J = 2.8 Hz). 더욱이 이 물질이 편광에 대한 회전도([α]_D)가 전혀 없으며 UV spectrum에서도 강한 흡광 band가 372 nm에서 발견된 사실도 이를 지지하였다. 이와

함께 carbon NMR data에서 $\delta 172.8$ 에 나타난 quaternary signal은 IR spectrum에서 1700 cm^{-1} 에 나타난 흡광 band와 함께 하나의 conjugated carbonyl기로 해석되었다.

이러한 정보를 바탕으로 하여 95J-35-A의 구조는 ^1H COSY, NOESY, HMQC, HMBC 등 2차원 NMR 실험으로 결정되었다(Fig. 3-94~3-96). 먼저 이 물질에 속하는 모든 탄소와 탄소에 접합된 수소는 HMQC 실험으로 완벽히 지정되었다. ^1H COSY 실험에서 선형으로(sequentially) 연결된 4 개의 proton signals($\delta 8.00\sim 7.22\sim 7.18\sim 7.50$)로 이루어진 하나의 독립된 spin system이 발견되었다(Fig.). 이들 중에서 인접한 모든 수소 사이의 coupling constants($J\sim 8\text{ Hz}$)가 상당히 크다는 사실로부터 ortho-disubstituted aromatic ring의 존재가 드러났다. 또한 $\delta 11.64$ 에 나타난 D_2O -exchangeable downfield signal은 $\delta 8.08$ 에 나타난 수소 signal과 직접 연결되어 있었다($J = 2.8\text{ Hz}$). 그런데 전자의 signal은 NOESY 실험에서 $\delta 7.50$ 의 methine proton과 강한 correlation을 나타내었다. 이로써 하나의 3-substituted indole moiety의 존재가 결정되었다. 동일한 방법으로 $\delta 12.50$ 에 위치한 signal의 수소를 1-NH로 하는 다른 하나의 3-substituted indole의 존재가 밝혀졌다. 이들 두 개의 indole 구조는 HMBC 실험에서 여러 개의 2-, 3-bond correlations가 발견됨으로서 의심할 바 없이 증명되었다.

상기한 두 개의 indole을 제외한 나머지 부분의 구조 역시 NMR 실험에 의하여 결정되었다. Downfield에 나타난 하나의 수소 signal($\delta 8.06$, 1H, s)은 다른 수소 signals와 전혀 coupling을 이루지 않았다. HMQC 실험결과에 의하면 이 수소는 하나의 일반적인 olefinic carbon($\delta 117.1$, CH)에 접합되어 있었다. 그러나 이들 간의 coupling constant($^1J_{\text{CH}} = 176\text{ Hz}$)는 매우 커서 이 methine이 최소 두 종의 heteroatom이 포함된 ring에 속함을 알 수 있었다. 이를 지지하는 중요한 증거는 HMBC 실험에서 $\delta 8.06$ 의 수소 signal과 $\delta 141.8$ 과 131.9 에 나타난 quaternary carbons 간의 상관관계가 뚜렷이 나타난 점이다(Fig.3-96). 이 물질의 분자식이 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ 임을 고려할 때 두 개의 indole과 하나의 carbonyl($\delta 172.8$, C)에 해당하는 원자의 종류와 수를 제외하면 전기한 methine을 포함하는 heterocycle은 imidazole ring임이 분명하였다. 따라서 전기한 바와 같이 일반적인 NMR 용매에서 모든 수소와 탄소의 signals가 이중으로 나타난 것은 imidazole ring에서 NH 수소와 이중결합이 이동되어 생겨난 hydrogen이 1-N과 3-N에의 결합에 따른 ring 내부에서의 이중결합의 이동- tautomerism(^1H NMR spectrum에서의 integration 비 55:45) 때문으로 해석되었다.

Imidazole과 indole ring의 결합은 HMBC 실험에서 양자간의 correlations이 전혀 나타나지 않았기 때문에 부득이하게 NOESY 실험에 의하여 결정되었다. $\delta 8.06$ 에 나타난 imidazole proton은 indole의 H-2'($\delta 8.08$, 1H, d, $J = 2.8\text{ Hz}$) 및 H-4'($\delta 8.00$, 1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$) protons와 공간적으로 인접함을 보여주었다. 따라서 indole의 C-3'는 imidazole의 C-5와 서로 결합되어 있었다. 그러므로 다른 indole의

C-3", carbonyl carbon, imidazole의 C-1 등 세 개의 quaternary carbons는 서로 순차적으로 연결되어 있다는 것이 논리적으로 유일한 결론이었다. 이와 같이 물질 95J-35 A의 구조는 carbonyl기를 가진 bis(indoloyl) imidazole로 결정되었다(Fig. 3-88).

본문 조사 결과 물질 95J-35-A는 1987년 지중해에 서식하는 해면 *Topsentia genitrix*로부터 분리된 topsentin A 임이 밝혀졌다(Bartik, et al, 1987). 또한 동일한 물질이 그 직후 Bahama 근처의 심해에서 채집된 해면 *Spongosorites* spp.로부터 분리되어 deoxytopsentin으로 명명되었다(Tsujii, et al, 1988). 함께 분리된 다른 수종의 유도체는 강력한 항종양, 항바이러스, 및 소염효과를 나타내어 물질특허를 획득하였다(McConnell, et al, 1990; 1994). 이 물질을 시발로 하여 이후 발견된 10여종의 topsentin 및 nortopsentin 계열의 물질들은 발견자에 따라 다르게 명명되어 오랜 기간 혼선을 빚어 왔으나 최근에는 대부분 정리되어 95J-35-A의 경우는 deoxytopsentin으로 통일되었다(Murray, et al, 1995).

유사한 물질인 95J-35-B가 황색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 HREIMS와 ^{13}C NMR 분석에 의하여 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}_2$ 로 해석되었다(Fig. 3-97). 이 물질의 분광자료는 95J-35-A와 상당히 유사하였으나 UV spectrum에서 286(log ϵ 3.91) nm에 새로운 강한 흡광 band가 관찰되었다. 그러나 IR spectrum에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 두 물질의 NMR 자료를 세밀히 비교한 결과 물질 95J-35-A의 1-carbonylimidazole ring이 95J-35-B에도 함께 존재한다는 것이 드러났다(Fig. 3-98 and 3-99). 그러나 indoles 에 해당하는 탄소와 수소의 chemical shifts와 splitting mode에는 상당한 변화가 발견되었다. 먼저 ^1H COSY 실험에서 서로 순차적으로 연결되는 4개의 aromatic protons(indole의 B ring) 대신에 95J-35-B에서는 단지 3 개의 protons에 해당하는 signals 만이 발견되었다: δ 7.92(1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.71(1H, d, $J = 1.4$ Hz), 7.30(1H, dd, $J = 8.7, 1.4$ Hz)(Fig.). 이들의 coupling constants와 결합 형태로 미루어 보아 물질 95J-35-A의 3-substituted indole이 95J-35-B에서는 3,5- 혹은 3,6-disubstituted indole로 변화하였음을 알 수 있었다. 마찬가지로 다른 indole ring 또한 유사한 pattern의 disubstituted indole로 변화하였다. δ 8.01(1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.93(1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.81(1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz). 이러한 구조적 변화는 HMQC 실험에 의한 1-bond H-C correlation 자료를 기초로 하여 이루어진 HMBC 실험에서 이 둘 protons와 인접한 methine 및 quaternary carbons 간에 나타난 여러 개의 2-, 3-bond H-C correlations로 증명되었다.

물질 95J-35-B의 indole ring에서의 치환 형태는 NOESY 실험에 의하여 규명되었다. 먼저 δ 11.82에 위치한 NH proton과의 correlation에 의하여 δ 7.71의 methine proton이 H-7'로 지정되었다. 이 signal의 작은 coupling constant($J = 1.4$ Hz)로 미루어 heteroatom이 C-6'에 접합되어 있음을 알 수 있었다. 마찬가지로 δ 12.50에 나타난 NH proton과의 NOESY 상관관계에 의하여 H-7" proton의 위치가 δ 6.93으로 지정

되었으며 이 수소 signal의 작은 coupling constant($J = 1.8$ Hz)로부터 다른 치환기가 C-6'에 연결되었음이 밝혀졌다. 분자식으로부터 유추한 결과 95J-35-B의 indole rings의 치환기는 하나의 bromine과 하나의 hydroxyl기라는 사실이 드러났다. HMQC와 HMBC 실험에 의하여 C-5', C-6', C-7'의 chemical shifts는 δ 123.5(CH), 115.3(C), 115.1(CH)로 각각 지정되었다(Fig.). 또한 동일한 실험에 의하여 C-5'', C-6'', C-7''의 위치는 각각 δ 113.3(CH), 155.4(C), 98.2(CH)로 지정되었다. Aromatic ring에서 치환기가 인접한 탄소의 chemical shifts에 미치는 영향의 정도를 고려할 때, 물질 95J-35-B의 indole rings에 있어서의 치환 형태는 6'-bromo-6''-hydroxy가 분명하였다(Breitmaier & Voelter, 1987). 더욱이 C-6''에 인접한 수소원자의 chemical shifts가 각각 δ 6.81(1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-5'')와 6.93(1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7'')로 나타나 aromatic protons로서는 대단히 upfield shift된 것은 aromatic ring에서 hydroxyl group에 의한 ortho-effect에 의한 것이므로 6''-hydroxyindole의 존재를 더욱 지지하였다. 이와 같이 천연물 95J-35-B의 구조는 6'-bromine과 6''-hydroxyl기를 가진 bis(indoloyl)imidazole계 alkaloid로 결정되었다(Fig. 3-88). 문헌조사 결과 이 물질은 해면 *T. genitrix*로부터 보고된 topsentin B2 임이 밝혀졌다(Bartik, et al. 1987). 또한 동일한 물질이 같은 시기에 bromotopsentin라는 이름으로 심해에서 채집한 해면 *Spongosorites* spp.의 항바이러스 및 항암성분으로 보고된 바 있다(Tsujii, et al. 1988). 이 후 bromotopsentin은 해면 *Hexadella* sp.와 *Spongosorites ruetzleri*로부터도 추출된 바가 있다(Morris & Andersen, 1989; Sakemi & Sun, 1991). 최근에는 이 물질을 포함하여 유사한 topsentins와 nortopsentins가 인체의 $\alpha 1$ adrenergic receptor에 대한 ligand의 결합을 변화시킨다는 사실이 발견되었다(Phife, et al. 1996).

황색의 고체로 분리된 bromodeoxytopsentin(95J-35-C)의 분자식은 HREIMS와 ^{13}C NMR 자료에 의하여 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}$ 로 결정되었다(Fig. 3-100). 이 물질의 분광자료 특히 IR과 UV spectrum은 deoxytopsentin이나 bromotopsentin과 매우 유사하여 동일한 작용기와 chromophore를 갖고 있음을 나타내었다. 또한 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY, HMQC, HMBC 등의 자료의 비교를 통하여 1-carbonylimidazole과 하나의 indole moiety의 존재가 명확히 드러났다(Fig. 3-101 and 3-102). Deoxytopsentin(95J-35-A)의 ^{13}C NMR 자료와 비교하여 유일한 차이점은 indole에 속하는 aromatic methine 중의 하나가 quaternary carbon(δ 115.7, C)으로 변한 것이다. 이 탄소의 chemical shift와 물질 95J-35-C의 분자식을 비교한 결과 새로이 추가된 bromine 원자가 이 탄소에 결합된 것이 분명하였다.

Deoxytopsentin이나 bromotopsentin의 경우와 마찬가지로 이 물질의 구조는 2D NMR 실험에 의하여 결정되었다. ^1H COSY, HMQC 및 HMBC 실험의 결과는 bromine 원자가 indole의 C-5나 C-6에 결합되어 있다는 것을 나타내었다: δ 7.88(1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.71(1H, d, $J = 1.4$ Hz), 7.29(1H, dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz). NOESY 실험에서 δ

11.81(1H, d, $J = 2.8$ Hz)에 나타난 NH signal이 $\delta 7.71$ 에 위치한 수소와 강한 correlation을 보여주었으며 이 수소 signal의 작은 1,3-coupling constant는 bromine의 접합점이 indole의 C-6라는 것을 지시하였다(Fig. 3-103). 또한 HMBC 실험에서 $\delta 7.88$ 에 나타난 수소와 $\delta 103.6$ 에 위치한 탄소 signal과의 3-bond correlation도 이를 지지하였다(Fig. 3-104). 이 물질의 ^1H NMR 및 COSY 자료를 95J-35-A 및 -B의 자료와 세밀히 비교한 결과 NH 수소의 chemical shift($\delta 11.81$)가 후자의 NH-1'과 대단히 유사하였으므로(95J-35-A, $\delta 11.64$; 95J-35-B, $\delta 11.82$) bromine의 치환된 위치는 분자의 eastern side indole의 C-6'로 결정되었다. 따라서 신물질 95J-35-C의 구조는 bromodeoxytopsentin old naming system에 따르면 6'-bromotopsentin A-로 정의되었다 (Bartik, *et al*, 1987; Tsujii, *et al*, 1988).

전기한 바와 같이 topsentins의 구조 결정에 있어서 가장 어려운 점은 indoles, imidazole, carbonyl group 등 모든 부분구조 간의 연결이 HMBC 실험으로 증명되지 않는다는 점이다. 이는 이들 부분구조 사이에 위치한 H-C couplings의 크기가 작아 (< 4 Hz) 일반적인 HMBC 실험의 영역을 벗어나기 때문으로 생각된다. 이를 해결하기 위하여 본 연구에서는 NMR 분석과 논리적 해석에 의하여 제시된 95J-35-C의 구조의 확인을 질량분석 자료의 해석으로 시도하였다(Fig. 3-100). 이 물질의 EIMS에서 m/z 289(상대강도 40)과 287(35)에 나타난 쌍둥이 peaks(^{81}Br 과 ^{79}Br 에 의한)는 [M-indole-H]에 해당하였고 m/z 116(12)의 peak는 [indoloyl group]에 해당하였으므로 하나의 monosubstituted indole기의 존재가 입증되었다. 또한 m/z 144(52)에 나타난 peak는 [3-carbonyl indole]에 해당함으로써 bromine이 접합되어 있지 않은 indole이 95J-35-C의 western side에 위치함을 나타내었다. 이로서 신물질 bromodeoxytopsentin의 구조가 명확히 결정되었다(Fig. 3-88).

유사한 물질인 isobromodeoxytopsentin(95J-35-D)가 황색의 무정형 고체로 분리되었다. 질량분석에 의하여 분자식이 $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{O}$ 로 결정된 이 물질의 분광자료는 95J-35-C와 대단히 흡사하였다(Fig. 3-105~3-107). IR, UV, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY, HMQC, HMBC 등의 실험결과는 이 물질이 6-bromoindole, indole, 1-carbonylimidazole 등 95J-35-C의 모든 부분구조를 갖고 있음을 나타내었다. 그러나 ^1H NMR 자료에 대한 정밀한 분석결과는 동일한 coupling pattern에도 불구하고 두 물질의 수소 signals의 위치에 있어서 상당한 차이가 있음을 드러내었다. Bromodeoxytopsentin에서 bromine이 접합된 indole의 NH proton의 signal이 $\delta 11.81$ (1H, d, $J = 2.8$ Hz)에 나타났으나 95J-35-D에서는 동일한 수소가 $\delta 12.44$ (1H, d, $J = 3.4$ Hz)에 위치하였다. 또한 이 수소와 NOESY correlation을 나타내는 signal의 위치와 coupling mode($\delta 7.78$, 1H, d, $J = 1.9$ Hz)로 미루어 보아 95J-35-D에서는 bromine이 분자의 western hemisphere에 위치한 indole의 C-6"에 접합함을 알 수 있었다.

Bromodeoxytopsentin과 마찬가지로 isobromodeoxytopsentin(95J-35-D)의 부분

구조의 결합도 질량분석에 의하여 이루어 졌다. EIMS spectrum에서 m/z 209 에 매우 큰 peak (상대크기 87)가 나타났다(Fig. 3-105). 이 fragment는 bromodeoxytopsentin 에서는 전혀 나타나지 않았던 것으로서 두 물질의 substitution pattern의 차이를 나타내는 주요한 증거이다. HRMS 분석에 의해서 이 fragment는 [M - bromoindole - H]에 해당하는 것으로 나타났으며 이는 95J-35-D의 C-8 carbonyl기와 6"-bromoindole 사이의 C-C bond의 절단에 해당하는 것이다. 이 bond는 topsentins의 high-energy EI mass의 fragmentation에서 가장 쉽게 절단되는 것이므로 이러한 fragment의 발견은 6-bromoindole moiety가 95B-35-D의 western side에 위치함을 나타낸다(Bartik, et al, 1987; Tsujii, et al, 1988). 이 밖에도 m/z 289(상대크기 46)와 287(47)에 나타난 한 쌍의 peaks는 [M-indole-H]에 대하여 m/z 116(16)과 함께 하나의 indole이 eastern side에 존재함을 입증하는 것이다. 이와 같이 bis(indoloyl)imidazole계 신물질 95B-35-D의 구조는 하나의 bromine이 C-6"에 결합된 isobromodeoxytopsentin-old naming system에 의하면 6"-bromotopsentin A-로 결정되었다(Fig. 3-88).

Topsentins와 nortopsentins 등 bisindole alkaloids는 매우 다양하고 강력한 생리활성 효과를 나타낸다. 널리 알려진 몇 가지 예로서는 항박테리아, 항진균, 항종양, 항바이러스, 소염, 인체의 $\alpha 1$ adrenergic receptors에 대한 ligand의 결합력의 변화 등이다(Tsujii, et al, 1988; Sakemi & Sun, 1991; Murray, et al, 1995; Mancini, et al, 1996; Phife, et al, 1996). 본 연구에서는 신물질 95J-35-C와 -D의 항암활성을 인체의 백혈병 세포 K562에 대하여 측정한 결과 중정도의 독성을 갖고 있음을 발견하였다(LC₅₀ 0.9 μ g/mL for 95J-35-C; 2.1 μ g/mL for 95J-35-D).

3. 실험방법

가. 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 flash chromatography

해면 *Spongosorites genitrix* (시료번호 95J-35)는 1995년 11월 제주도 서귀포 근해 문섬 주변의 수심 20-30 m 지역에서 SCUBA 다이빙으로 채집되었다. 이 시료의 표본은 현재 한남대학교 부설 자연사박물관의 해면동물 부문에 심정자 교수의 관리하에 전시 중이다. 현장에서 드라이아이스로 급속 냉동된 시료는 연구실로 항공 운송되어 화학적인 분석이 이루어질 때까지 -25 °C에서 보관되었다. 저온에서 감압 건조된 시료 (1.3 kg)는 Waring blender로 분쇄된 후 MeOH(3 L x 3)과 dichloromethane (3 L x 2)로 반복 추출하였다. 이들 추출액을 합하여 감압 증류시켜 획득한 유기물질 (89.2 g)에 대해서는 물과 *n*-BuOH를 이용하여 극성과 용해도에 따른 분배를 하였다.

BuOH 층을 감압 건조한 후(건조중량 56.9 g) 이들을 다시 *n*-hexane(8.7 g)과 15% aqueous MeOH(46.8 g)을 이용하여 극성에 따른 분배를 하였다. Aqueous MeOH 층의 일부(8.7 g)을 선택하여 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography를 하였다. 용출 순서에 따른 용리액은 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aq. MeOH, 100% MeOH, acetone, EtOAc 이었다.

나. 천연물의 분리정제

Flash chromatography로 얻어진 분획 중에서 brine-shrimp에 대한 독성이 높고 (LC₅₀ < 20 ppm) ¹H NMR 분석에서 이차대사물질의 존재가 확인된 20% aq. MeOH 층 (1.64 g)을 감압 건조한 후 50% EtOAc/hexane에 용해시켜 silica Sep-pak column으로 filter한 후에 용출물에 대하여 silica semi-preparative HPLC(YMC silica column, 1 cm x 25 cm, elution speed 3.5 mL/min, *n*-hexane:EtOAc:THF = 5:3:2)를 하여 95J-35-A, -B, -C, -D등 4종의 천연물을 획득하였다. 이들은 모두 C₁₈ reversed-phase semi-preparative HPLC(YMC ODS-A column, elution speed 1.5 mL/min, MeOH:H₂O:THF = 6.5:2.5:1)로서 정제를 하였다. 최종적으로 분리 정제된 천연물의 양은 물질 95J 35-A~-D 별로 각각 204.6, 155.6, 119.5, 120.4 mg 이었다.

한편 reversed-phase flash chromatography에서 10% aq. MeOH로 용출한 층(1.17 g)에 대해서도 동일한 silica 및 C₁₈ reversed-phase HPLC를 거쳐 천연물을 분리정제 한 결과 95J-35-A, -B, -C등 20% aq. MeOH 층에서 분리된 것과 동일한 천연물이 각각 150.3, 186.7, 79.1 mg 얻어졌다.

Deoxytopsentin (= Topsentin A: 95J-35-A) - yellow amorphous solid: mp > 280 °C. IR (KBr) ν_{\max} 3400 (broad), 2920, 2850, 1700, 1600, 1515, 1455, 1425, 1110 cm⁻¹. UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 372 (4.17), 251 (4.24), 210 (4.57) nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 12.50 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-1"), 11.64 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-1'), 8.79 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2"), 8.29 (1H, dd, *J* = 6.4, 2.3 Hz, H-4"), 8.08 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-2'), 8.06 (1H, s, H-4), 8.00 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4') 7.58 (1H, dd, *J* = 6.9, 2.3 Hz, H-7"), 7.50 (1H, br d, *J* = 7.3 Hz, H-7'), 7.32 (1H, m, H-6"), 7.30 (1H, m, H-5"), 7.22 (1H, ddd, *J* = 7.3, 6.9, 0.9 Hz, H-6'), 7.18 (1H, ddd, *J* = 7.8, 6.9, 0.9 Hz, H-5'): ¹³C NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 172.8 (C, C-8"), 141.8 (C, C-2), 138.4 (CH, C-2"), 136.8 (C, C-7a"), 136.5 (C, C-7a'), 131.9 (C, C-5), 126.1 (C, C-3a"), 125.3 (CH, C-2'), 124.3 (C, C-3a'), 124.0 (CH, C-6"), 122.9 (CH, C-5"), 122.3 (CH, C-6'), 121.4 (CH, C-4"), 120.4 (CH, C-5'), 119.5 (CH, C-4'), 117.1 (CH, C-4), 113.7 (C, C-3"), 112.8 (CH, C-7"), 112.3 (CH, C-7'), 103.6 (C, C-3'); HMBC correlations H-4/C-2, C-5;

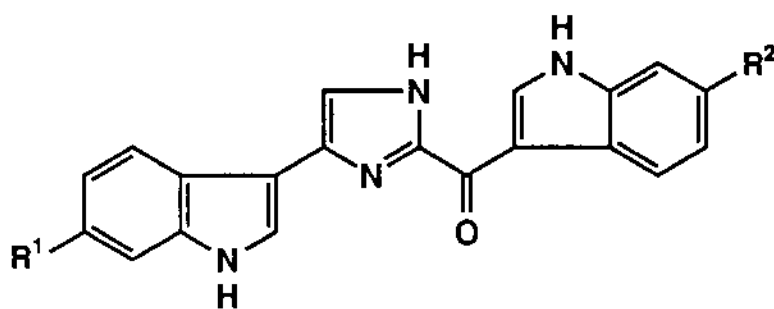
H-1'/C-3', C-3a', C-7a'; H-2'/C-3', C-3a', C-7a'; H-4'/C-3a', C-6': H-5'/C-7', C-7a'; H-6'/C-3a', C-4'; H-7'/C-5', C-7a'; H-2"/C-3", C-3a", C-7a"; H-4"/C-6", C-7a"; H-6"/C-4"; H-7"/C-5"; HREIMS [M]⁺ *m/z* observed 326.1176 (calculated for C₂₀H₁₄N₄O, 326.1168); LRMS *m/z* (relative intensity) 326 (100), 210 (10), 209 (967), 183 (12), 163 (11), 144 (35), 116 (12).

Bromotopsentin (= Topsentin B2: 95J-35-B) - yellow amorphous solid: mp > 280 °C IR (KBr) ν_{\max} 3400 (broad), 2920, 2850, 1700, 1585, 1525, 1450, 1425, 1360, 1230, 1160, 1110 cm⁻¹; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 375 (3.90), 286 (3.91), 238 (4.23), 210 (4.34) nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 12.50 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-1'), 11.82 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-1'), 8.44 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-2''), 8.11 (1H, s, H-4), 8.09 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-2'), 8.01 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-4''), 7.92 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-4'), 7.71 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-7'), 7.30 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, H-5'), 6.93 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-7''), 6.81 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-5''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 171.8 (C, C-8''), 155.4 (C, C-6''), 141.6 (C, C-2), 138.5 (C, C-7a''), 137.9 (C, C-2''), 137.6 (C, C-7a'), 130.8 (C, C-5), 126.7 (CH, C-2'), 123.5 (C, C-3a'), 123.5 (CH, C-5'), 122.2 (CH, C-4''), 121.4 (CH, C-4'), 118.8 (C, C-3''), 116.5 (CH, C-4), 115.3 (C, C-6'), 115.1 (CH, C-7'), 114.1 (C, C-3''), 113.3 (CH, C-5''), 103.4 (C, C-3'), 98.2 (CH, C-7''); HMBC correlations H-4/C-2, C-5; H-1'/C-3', C-3a', C-7a'; H-2'/C-3', C-3a', C-7'; H-4'/C-5', C-7a'; H-5'/C-3a', C-7'; H-7'/C-3a', C-6'; H-2"/C-3", C-3a", C-7a"; H-4"/C-6", C-7a"; H-5"/C-3a"; H-7"/C-3a", C-5", C-6"; HREIMS [M]⁺ *m/z* observed 422.0193 and 420.0217 (calculated for C₂₀H₁₃⁸¹BrN₄O₂ and C₂₀H₁₃⁷⁹BrN₄O₂, 422.0204 and 420.0222, respectively); LRMS *m/z* (relative intensity) 406 (97), 404 (100), 376 (18), 289 (40), 287 (35), 144 (52), 116 (12).

Bromodeoxytopsentin (95J-35-C) - yellow amorphous solid: mp 240-243 °C; IR (KBr) ν_{\max} 3300 (broad), 2920, 2850, 1705, 1590, 1520, 1455, 1420, 1360, 1235, 1110 cm⁻¹; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 367 (4.17), 250 (sh, 4.36), 235 (4.40), 209 (4.61) nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 12.58 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2''), 11.81 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-1'), 8.57 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2''), 8.23 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H-4''), 8.06 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-2'), 8.01 (1H, s, H-4), 7.88 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-4'), 7.71 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-7'), 7.58 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, H-7''), 7.33 (1H, m, H-6''), 7.31 (1H, m, H-5''), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 172.4 (C, C-8''), 141.7 (C, C-2), 139.1 (CH, C-2''), 137.9 (C, C-7a'), 137.5 (C, C-7a''), 131.2 (C, C-5), 127.0 (CH, C-2'), 126.3 (C, C-3a''), 124.8 (CH, C-6''), 123.9 (CH, C-5'), 123.8 (C, C-3a') 123.7 (CH, C-5''), 121.9 (CH, C-4''), 121.6 (CH, C-4'), 116.9 (CH, C-4).

115.7 (C, C-6'), 115.5 (CH, C-7'), 114.2 (C, C-3''), 113.4 (CH, C-7''), 103.6 (C, C-3'): HMBC correlations H-4/C-2, C-5; H-1'/C-3', C-3a'; H-2'/C-3', C-3a', C-7': H-4'/C-3', C-3a', C-6', C-7a': H-5'/C-3a', C-7': H-7'/C-3a', C-6; H-2''/C-3', C-3a'', C-7a'': H-4''/C-3a'', C-6'', C-7a'': H-5''/C-3a'': H-6''/C-4'': H-7''/C-3a'', C-5'', C-7a'': HREIMS [M]⁺ *m/z* observed 406.0250 and 404.0253 (calculated for C₂₀H₁₃⁸¹BrN₄O and C₂₀H₁₃⁷⁹BrN₄O, 406.0255 and 404.0273, respectively) LRMS *m/z* (relative intensity) 406 (96), 404 (100), 289 (40), 287 (35), 144 (52), 116 (12).

Isobromodeoxytopsentin (95J-35-D) - yellow amorphous solid: mp 225-230 °C; IR (KBr) ν_{\max} 3300 (broad), 2925, 1705, 1590, 1520, 1455, 1423, 1360, 1315, 1235, 1110 cm⁻¹; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 369 (4.02), 250 (sh, 4.21), 238 (4.23), 209 (4.43) nm; ¹H NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 12.44 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-1''), 11.54 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-1'), 8.95 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-2''), 8.24 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-4''), 8.03 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-2'), 7.98 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.2 Hz, H-4'), 7.91 (1H, s, H-4), 7.78 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-7''), 7.48 (1H, br d, *J* = 8.2 Hz, H-7'), 7.42 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, H-5''), 7.20 (1H, br dd, *J* = 8.2, 7.8 Hz, H-6'), 7.16 (1H, br dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆ + TFA) δ 174.1 (C, C-8''), 142.9 (C, C-2), 138.6 (CH, C-2''), 137.6 (C, C-8''), 136.6 (C, C-7a'), 133.1 (C, C-5), 125.5 (C, C-3a''), 125.4 (CH, C-5''), 124.8 (CH, C-2'), 124.6 (C, C-3a'), 123.3 (CH, C-4''), 122.3 (CH, C-6'), 120.3 (CH, C-5'), 119.7 (CH, C-4'), 118.7 (CH, C-4), 116.2 (C, C-6''), 115.5 (CH, C-7''), 113.8 (C, C-3'), 112.3 (CH, C-7'), 105.0 (C, C-3'); HMBC correlations H-4/C-2, C-5; H-1'/C-2', C-3', C-3a'; H-2'/C-3', C-3a', C-7a'; H-4'/C-6', C-7a'; H-5'/C-3a', C-7': H-6'/C-4', C-7a'; H-7'/C-3a', C-5': H-1''/C-3'', C-3a'': H-2''/C-3'', C-3a'', C-7a'': H-4''/C-5'', C-6'', C-7a'': H-5''/C-3a'', C-7'': H-7''/C-3a'', C-5'', C-7a'': HREIMS [M]⁺ *m/z* observed 406.0244 and 404.0266, respectively (calculated for C₂₀H₁₃⁸¹BrN₄O and C₂₀H₁₃⁷⁹BrN₄O, 406.0255 and 404.0273, respectively); [M-C₈H₆BrN]⁺ *m/z* 209.0601 (calculated for C₁₂H₇N₃O, 209.0590); LRMS *m/z* (relative intensity) 406 (99), 404 (100), 326 (37), 289 (46), 287 (47), 210 (910), 209 (87), 163 (18), 116 (16).



- 92J-2-A**($R^1 = R^2 = H$, deoxytopsentin)
92J-2-B($R^1 = Br$, $R^2 = OH$, bromotopsentin)
92J-2-C($R^1 = Br$, $R^2 = H$, deoxybromotopsentin)
92J-2-D($R^1 = H$, $R^2 = Br$, isodeoxybromotopsentin)

Fig. 3-88. Structures of the Topsisentin alkaloids from the sponge *Spongosorites genitrix*.

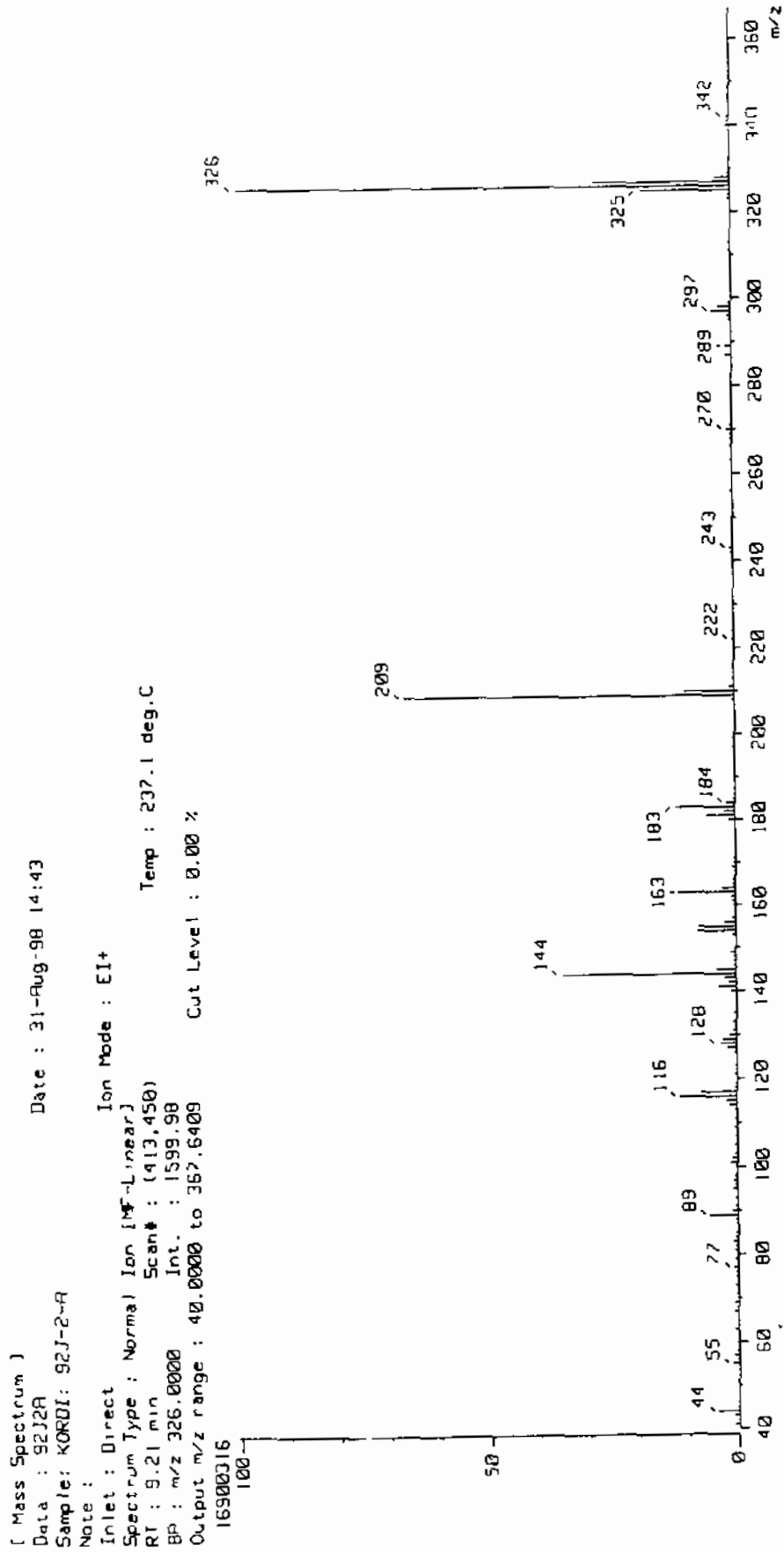


Fig. 3-89. HRMS spectrum of deoxytropsentin (96J-35-A).

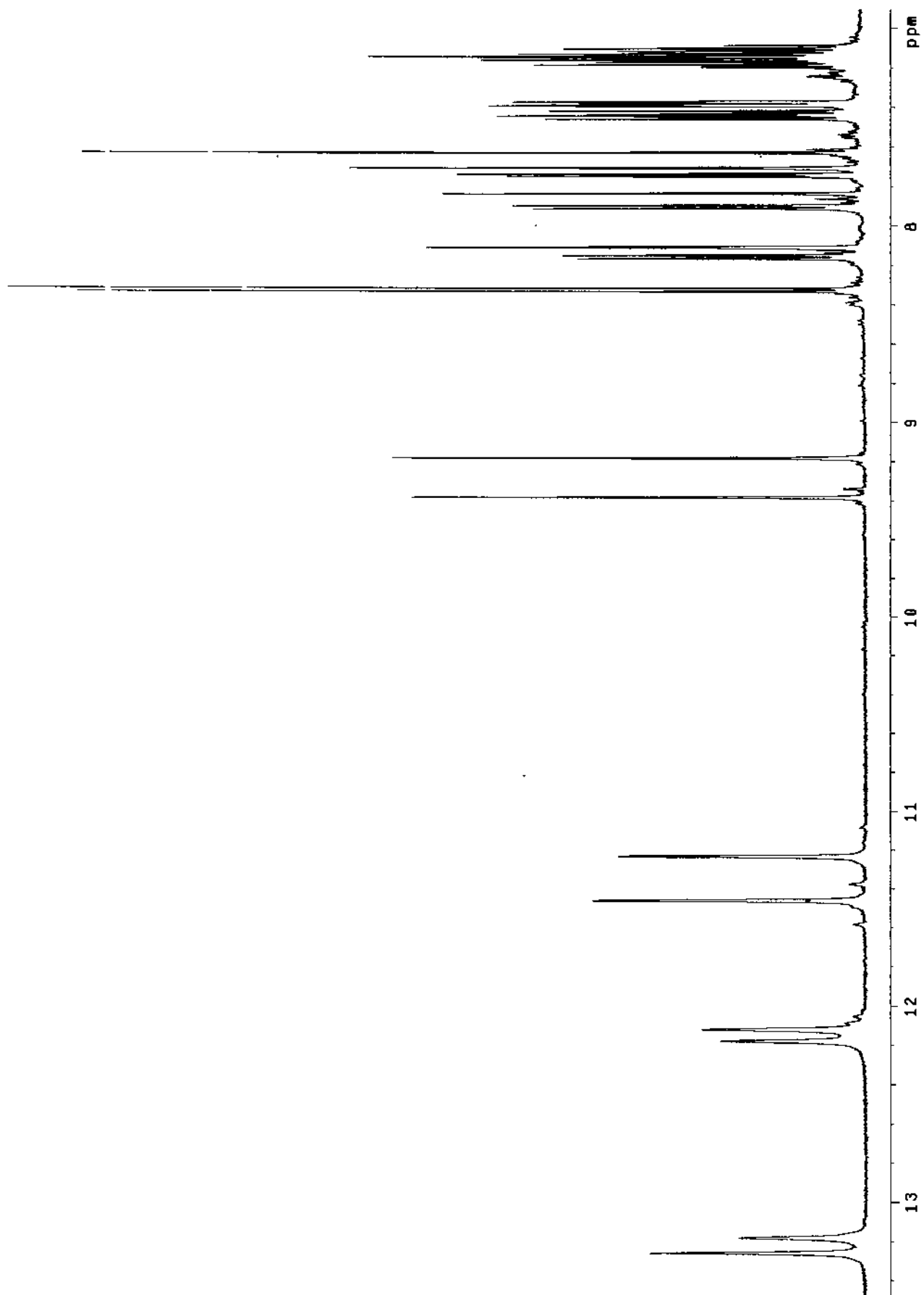


Fig. 3-90. Proton NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A) in DMSO-*d*₆.

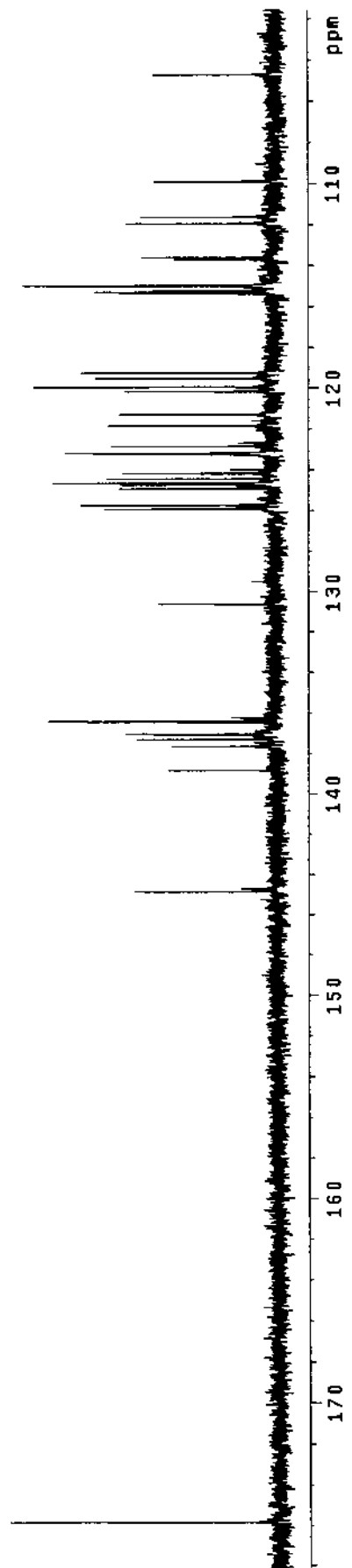


Fig. 3-91. Carbon NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A) in DMSO-*d*₆.

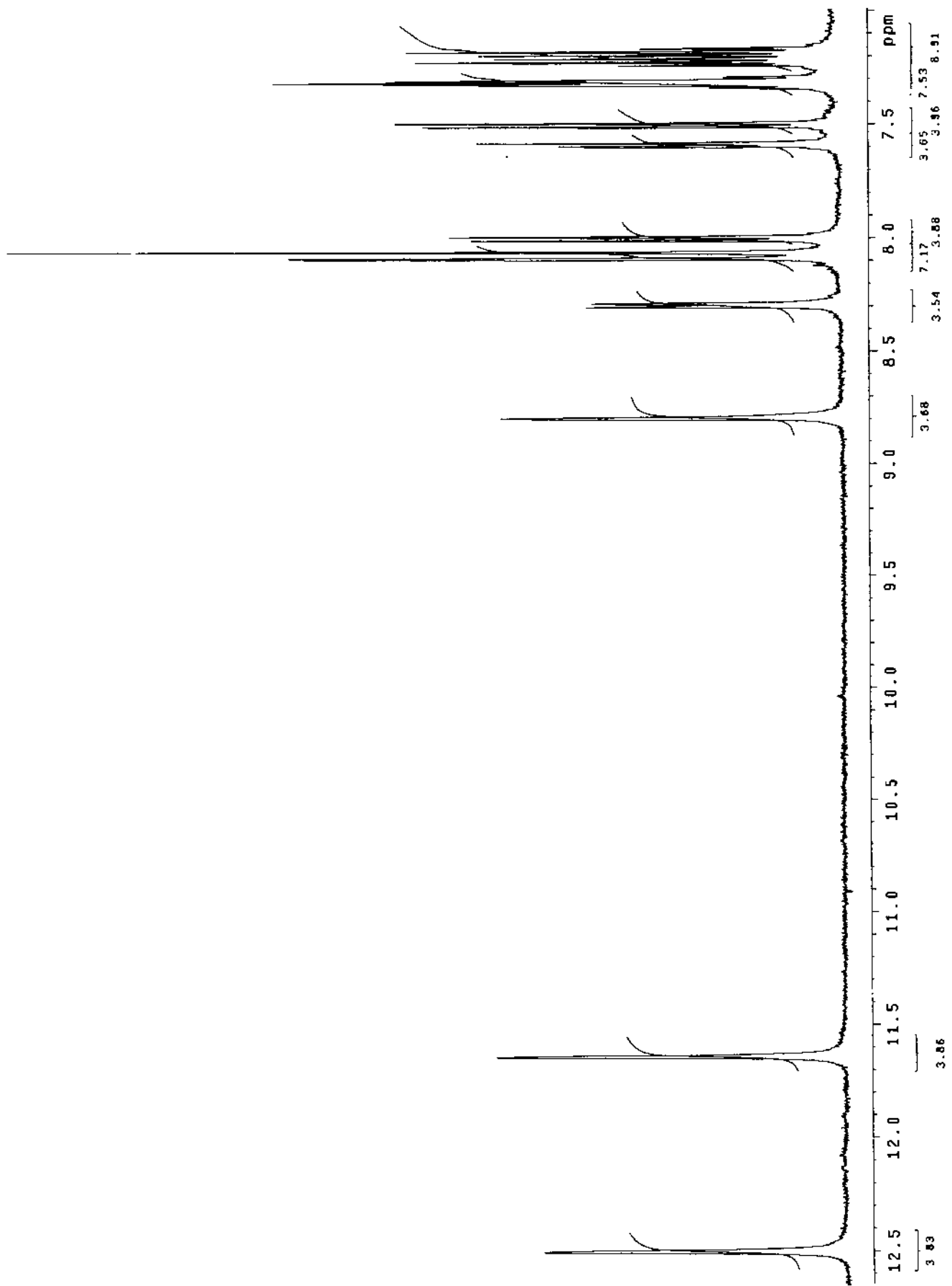


Fig. 3-92. Proton NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).

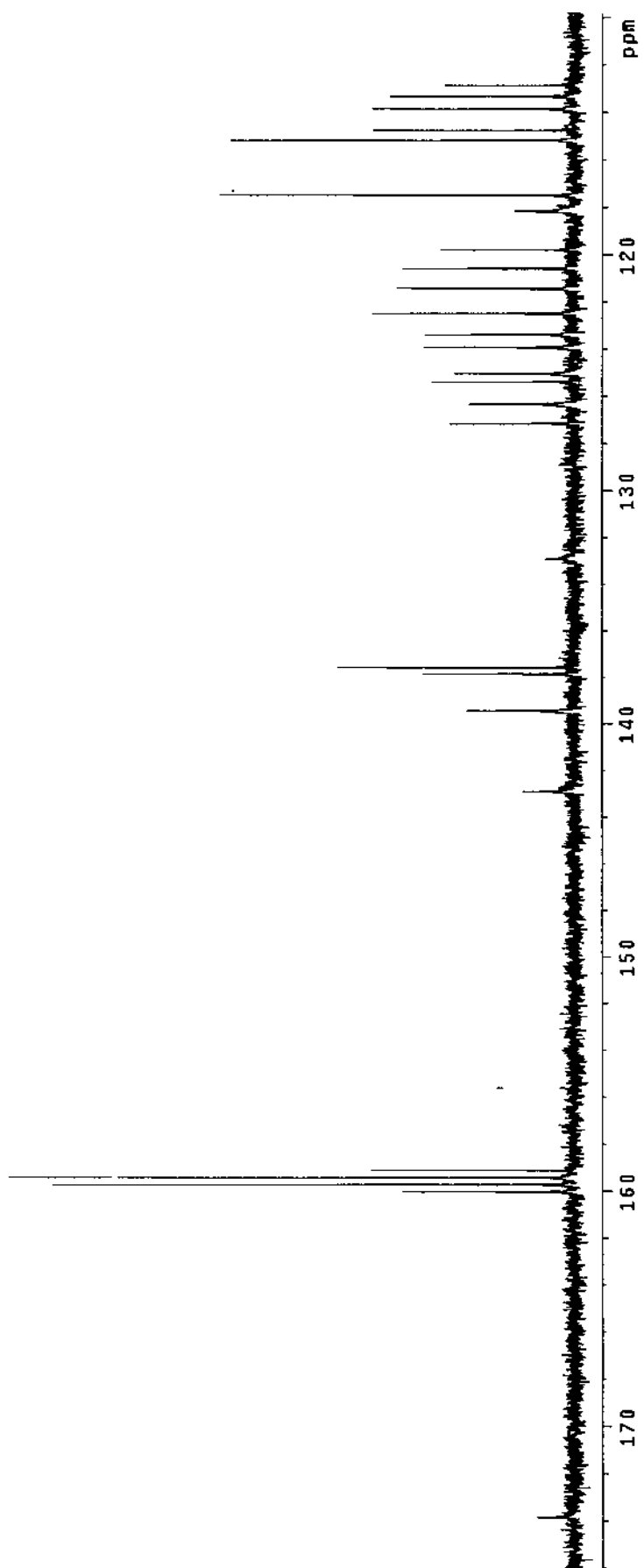


Fig. 3-93. Carbon NMR spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).

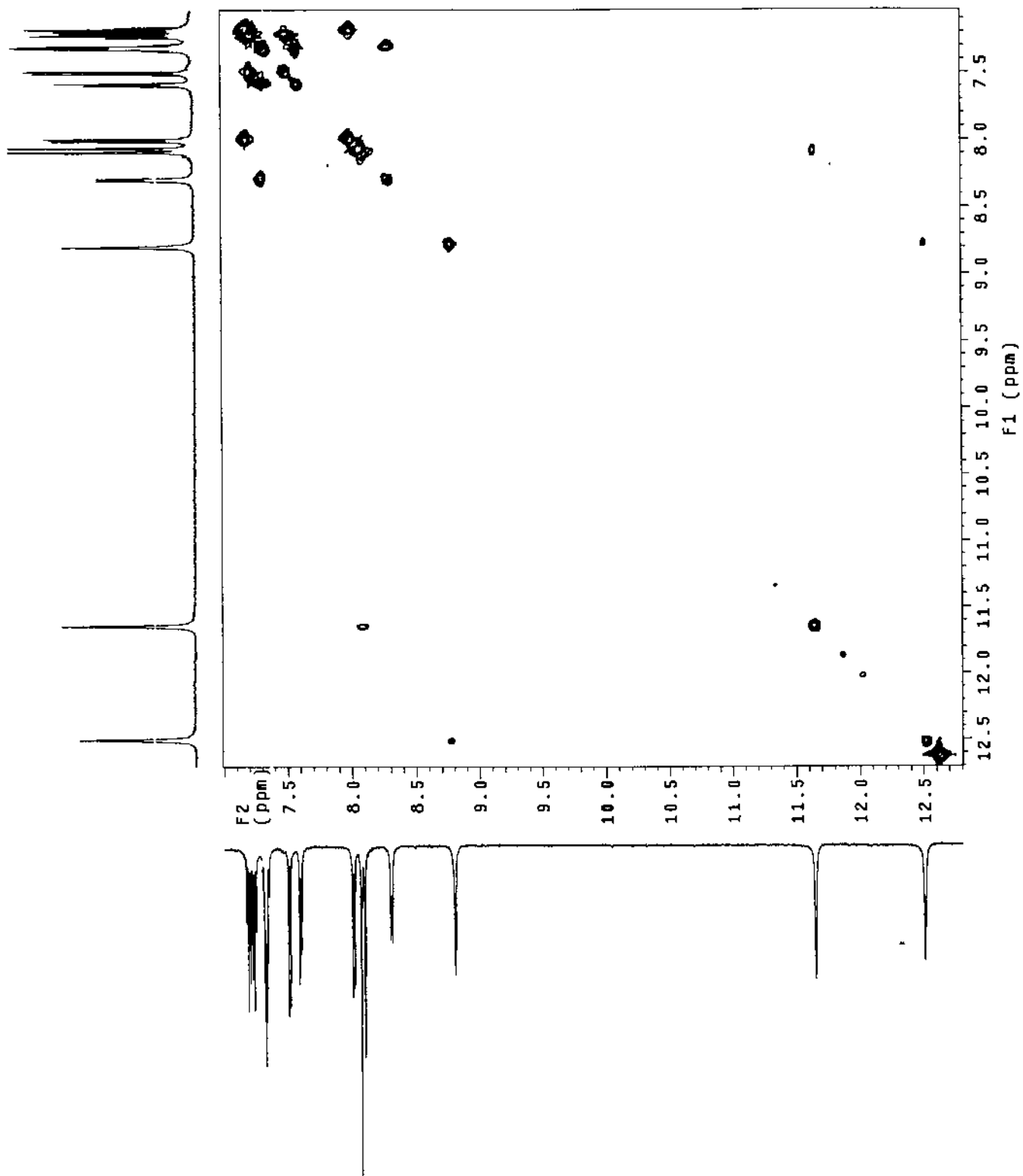


Fig. 3-94. Proton COSY spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).

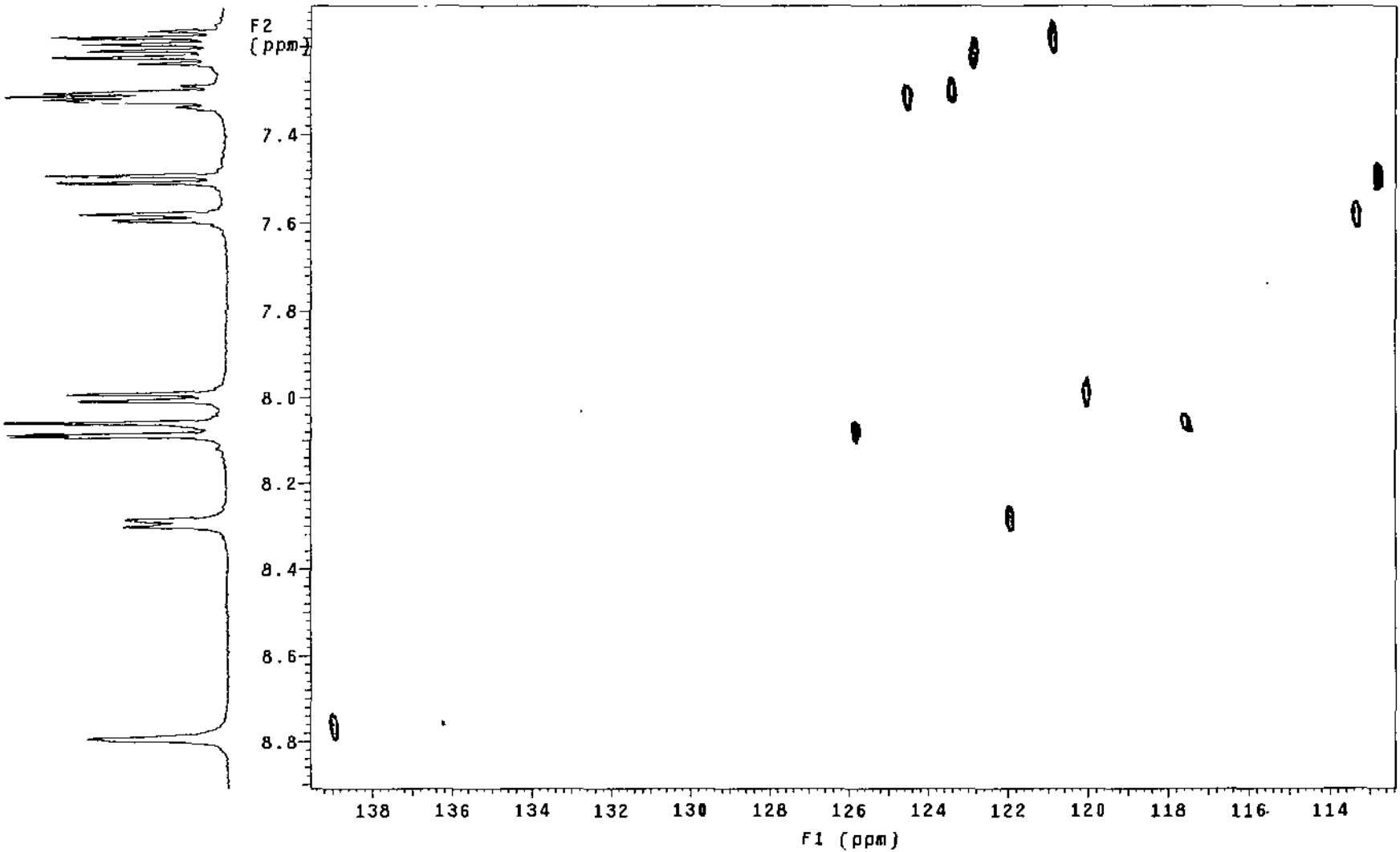
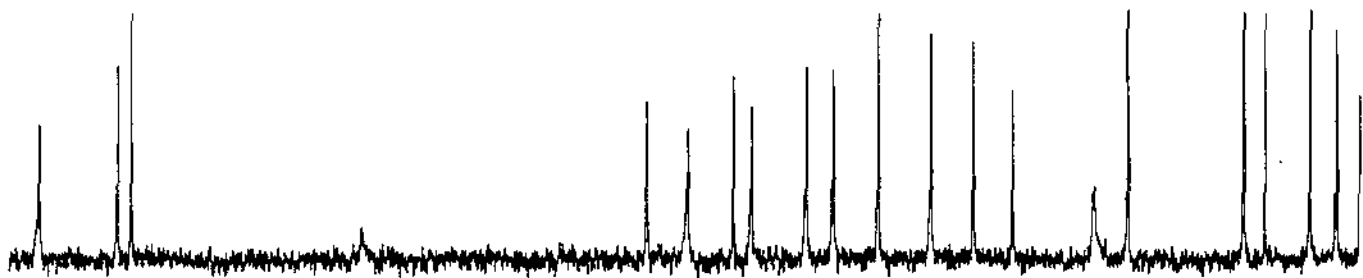


Fig. 3-95. HMQC spectrum of deoxytospentin (96J 35-A).

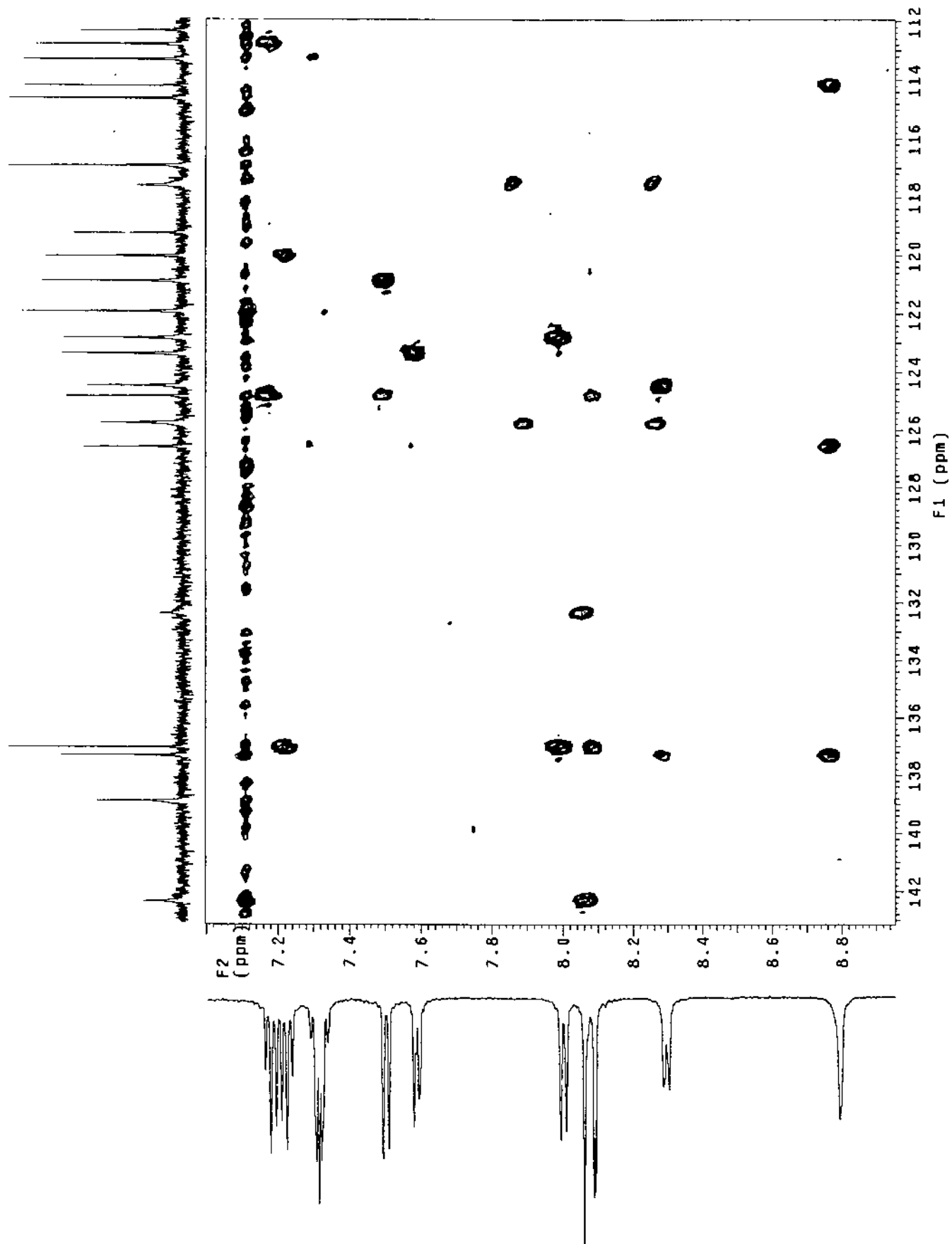


Fig. 3-96. HMBC spectrum of deoxytopsentin (96J-35-A).

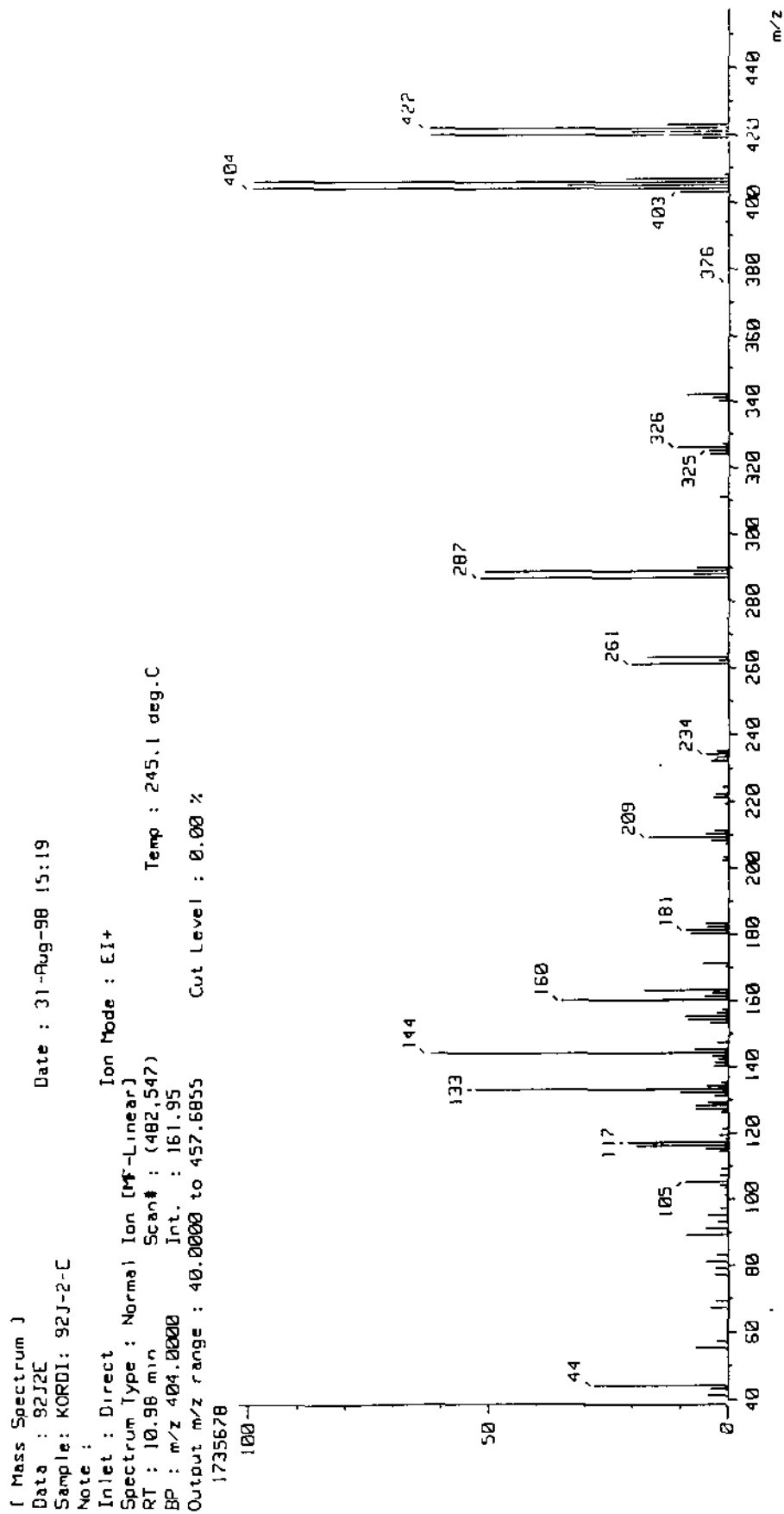


Fig. 3-97. HRMS spectrum of bromotopsentin (96J-35-B).

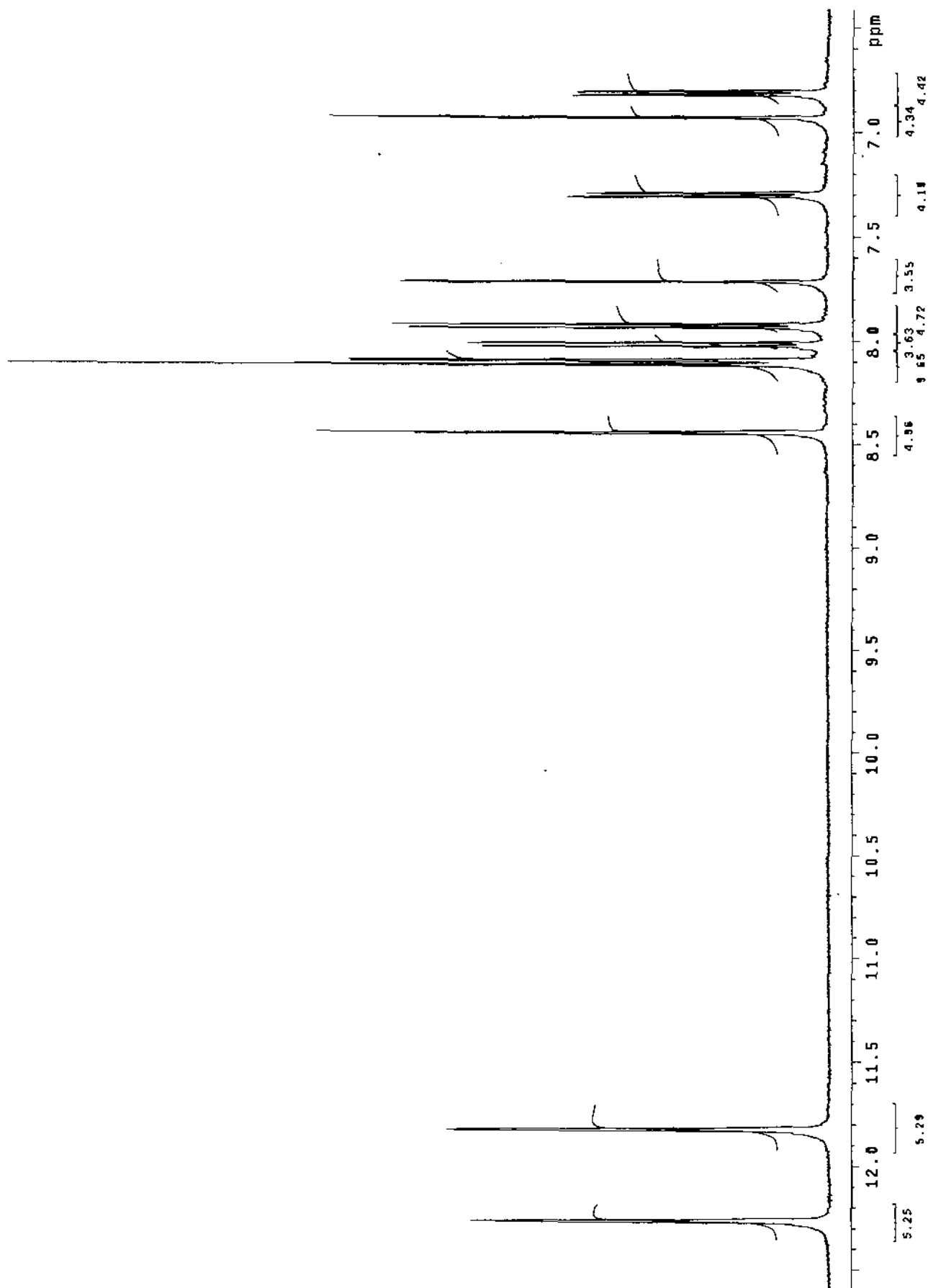


Fig. 3-98. Proton NMR spectrum of bromotopsentin (96J-35-B).

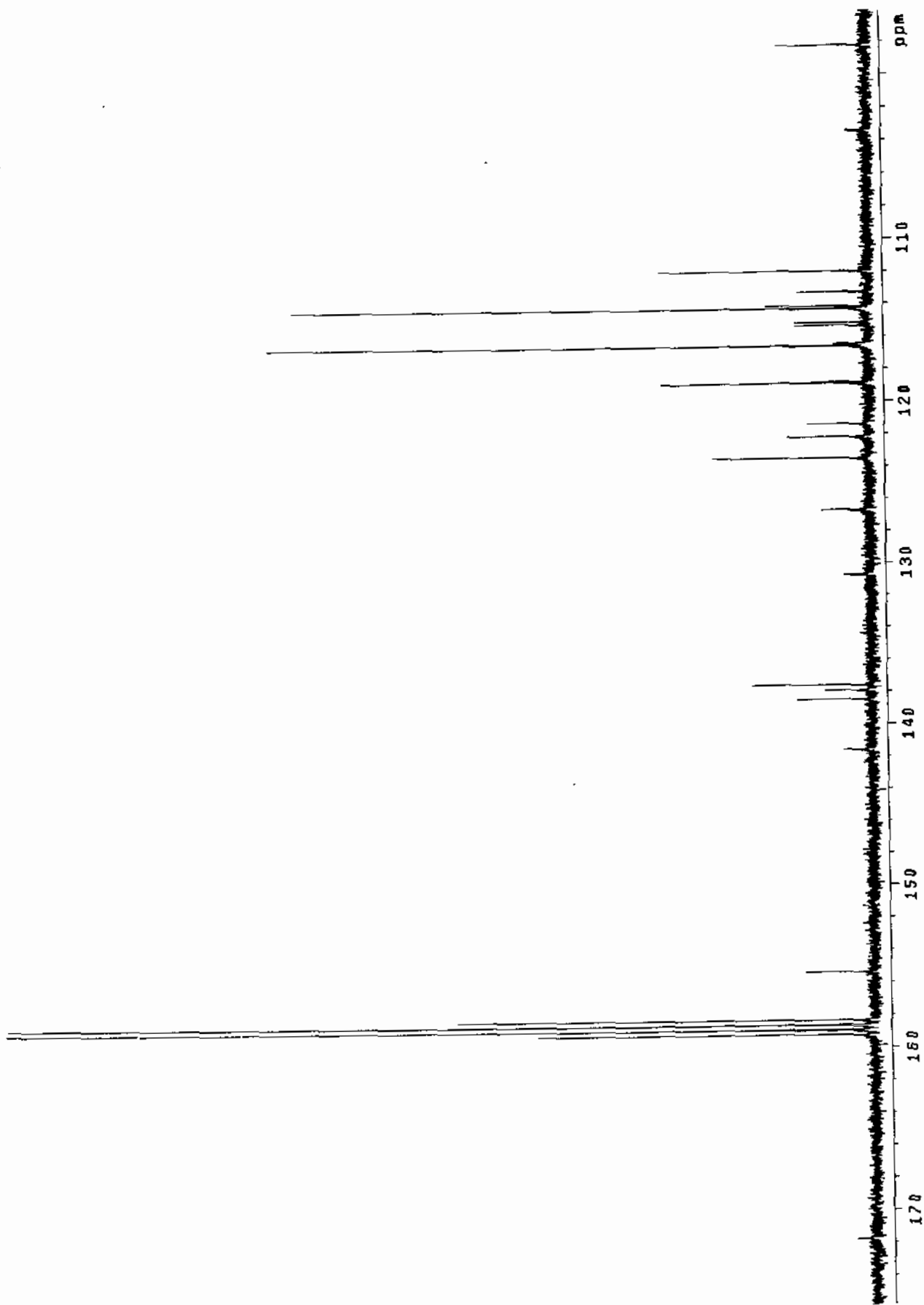


Fig. 3-99. Carbon NMR spectrum of bromotopsentin (96J-35-B).

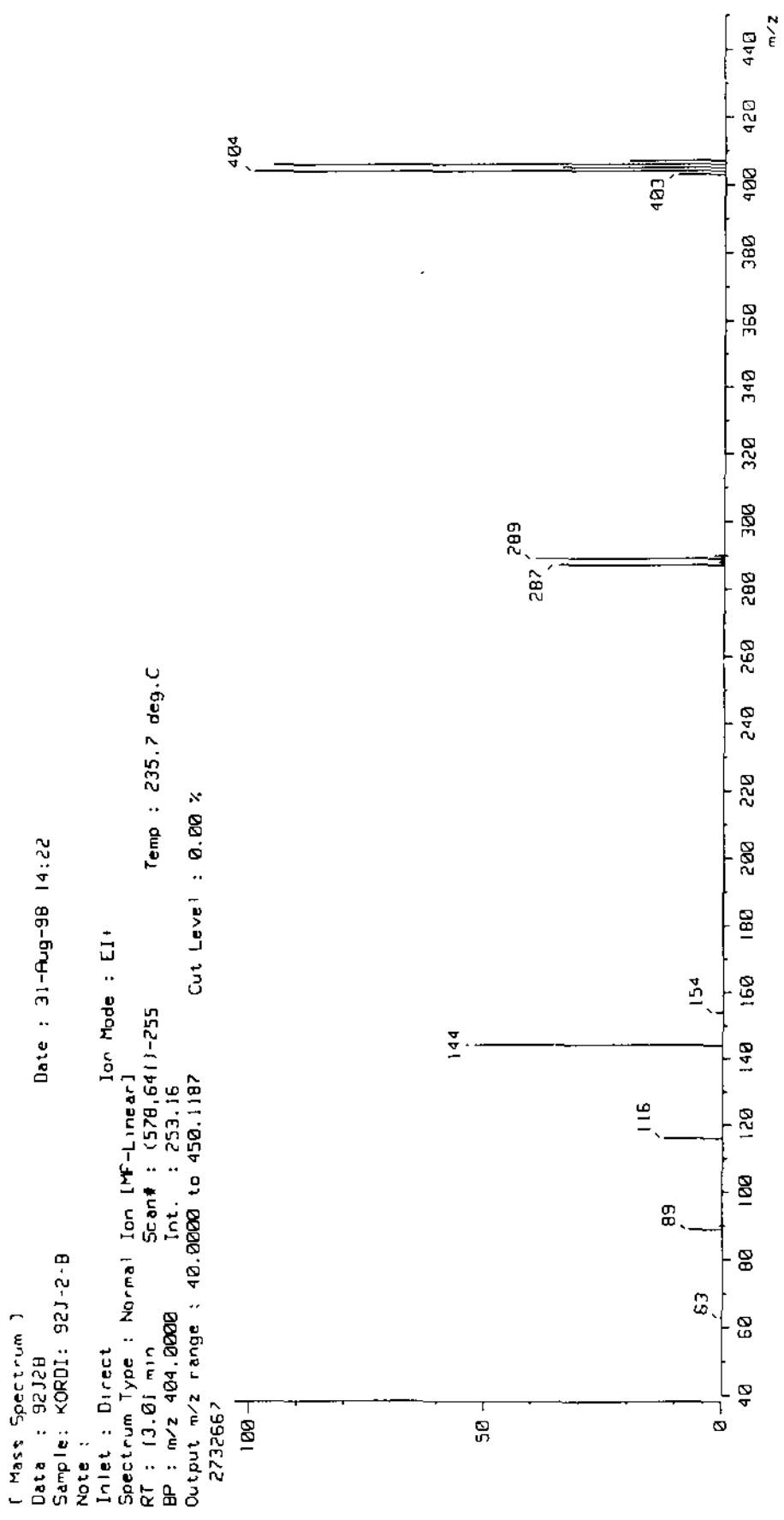


Fig. 3-100. HRMS spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C).

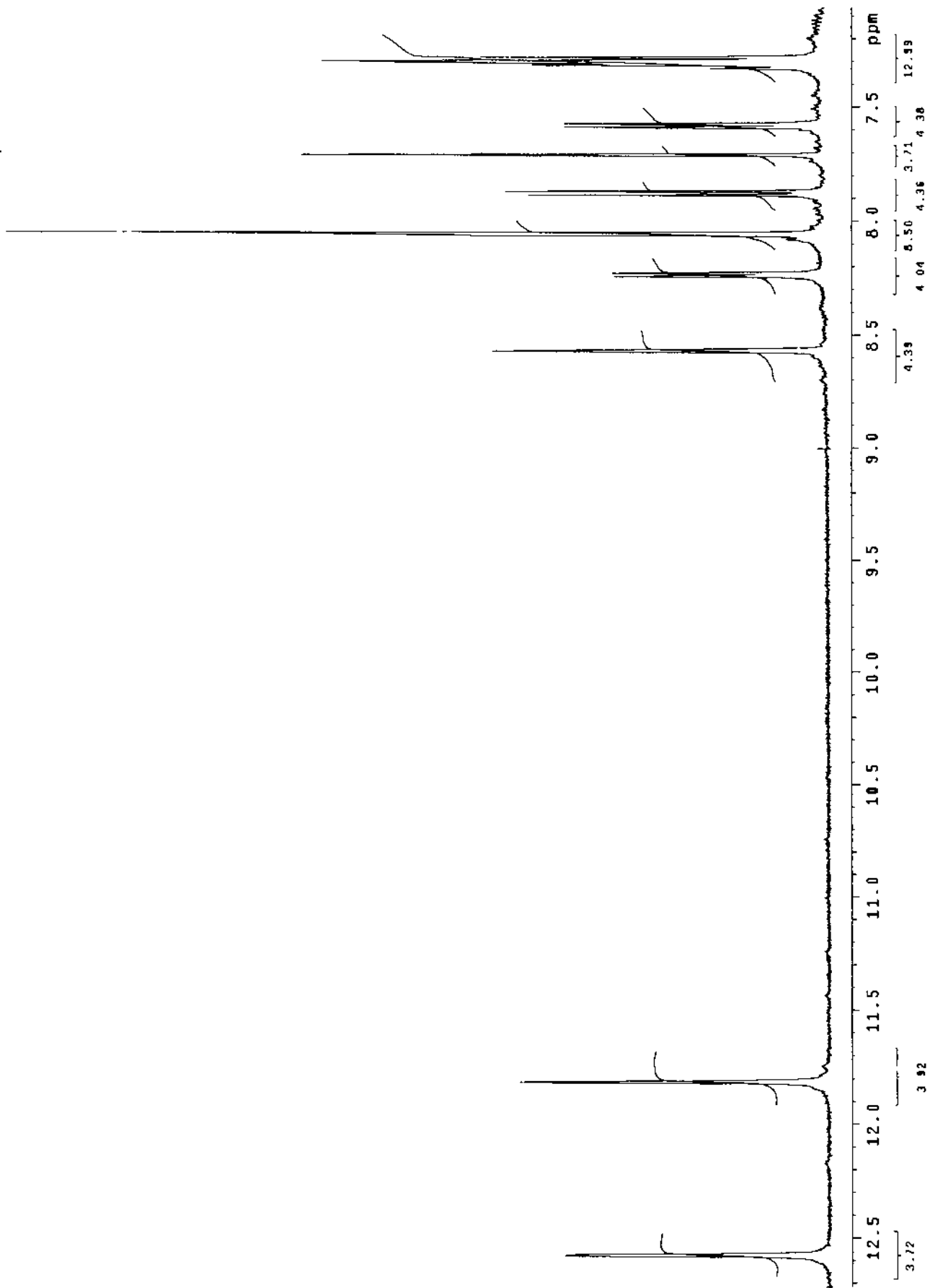


Fig. 3-101. Proton NMR spectrum of bromodeoxytospentin (96J-35-C).

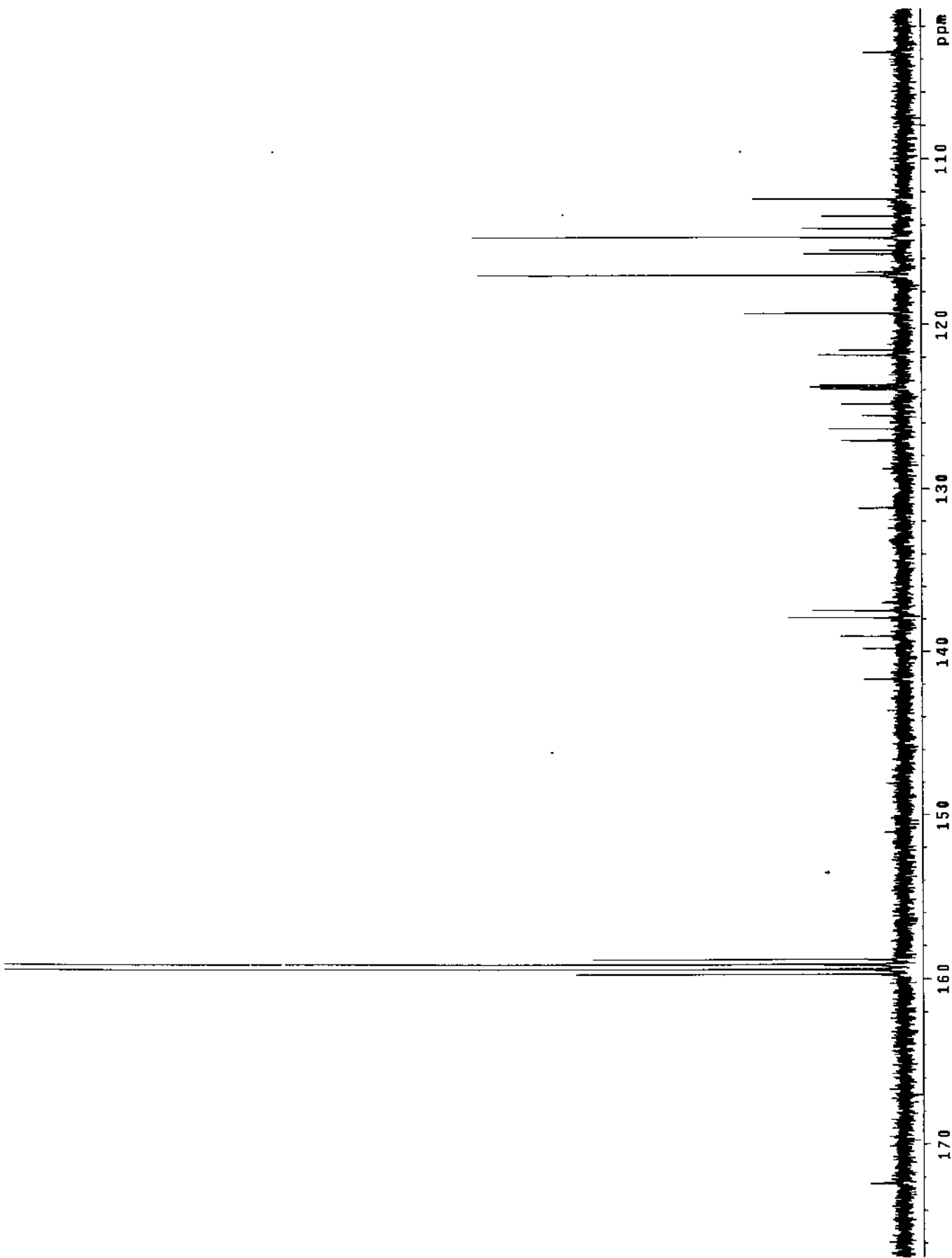


Fig. 3-102. Carbon NMR spectrum of bromodeoxytospentin (96J-35-C).

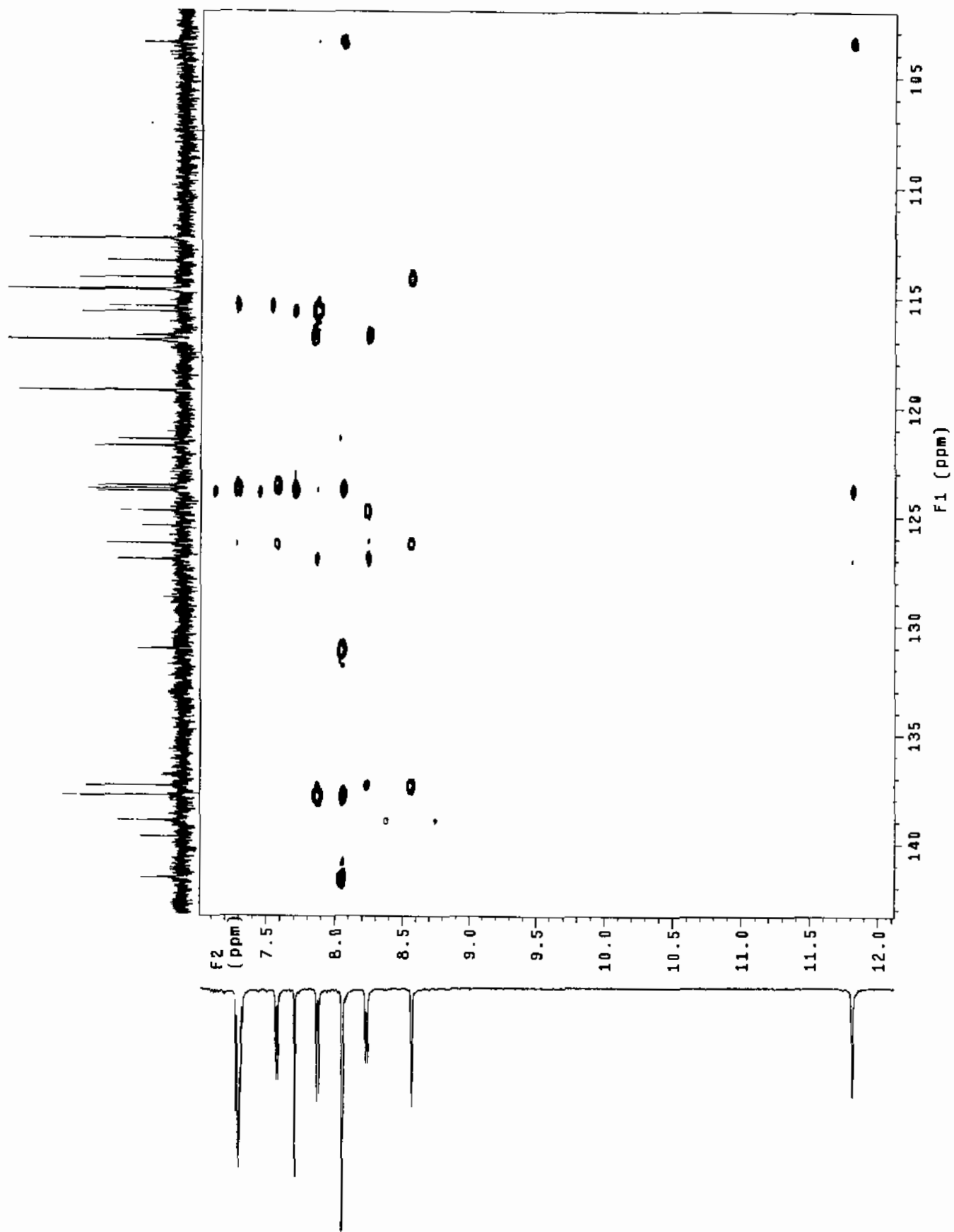


Fig. 3-104. HMBC spectrum of bromodeoxytopsentin (96J-35-C).

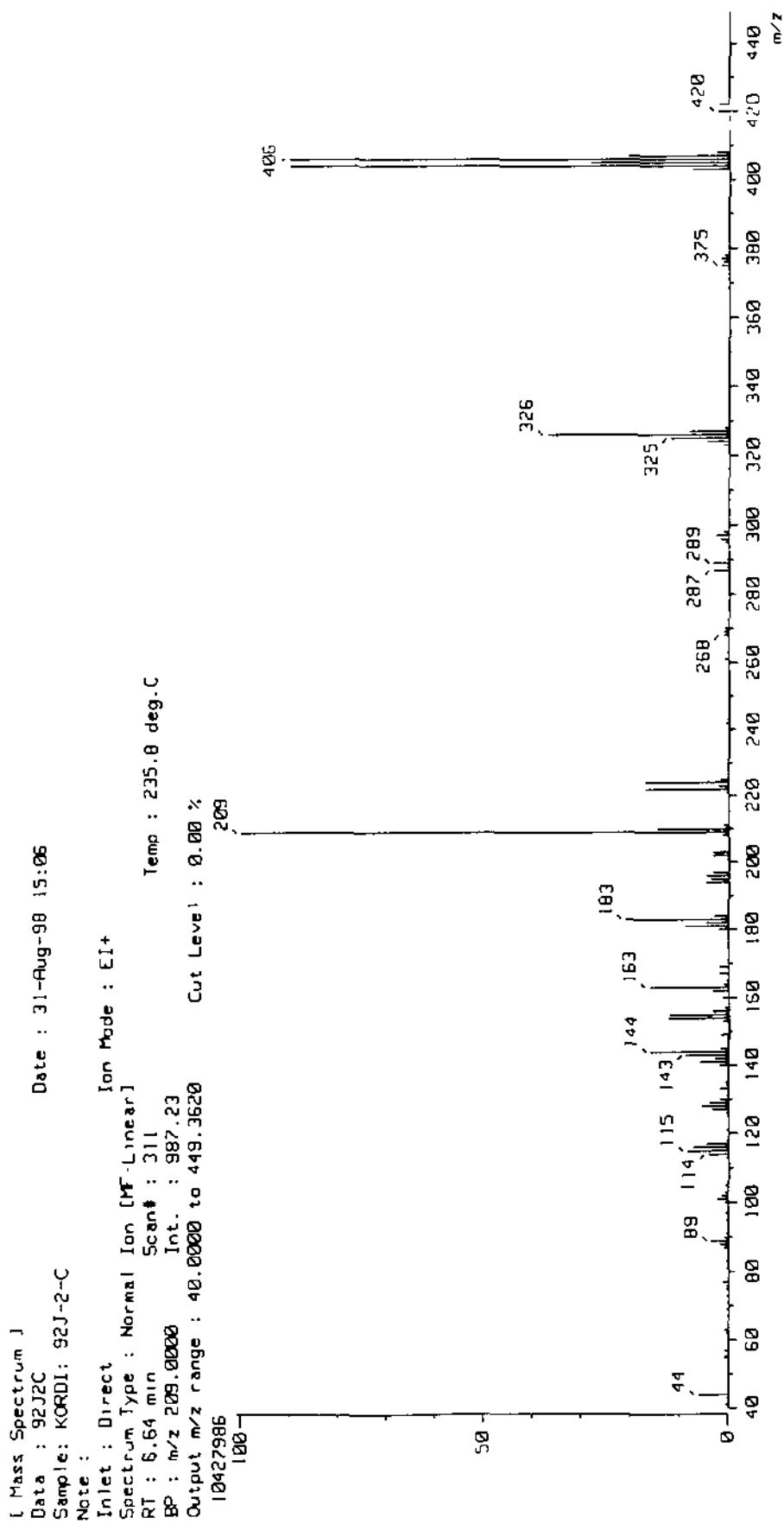


Fig. 3-105. HRMS spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D).

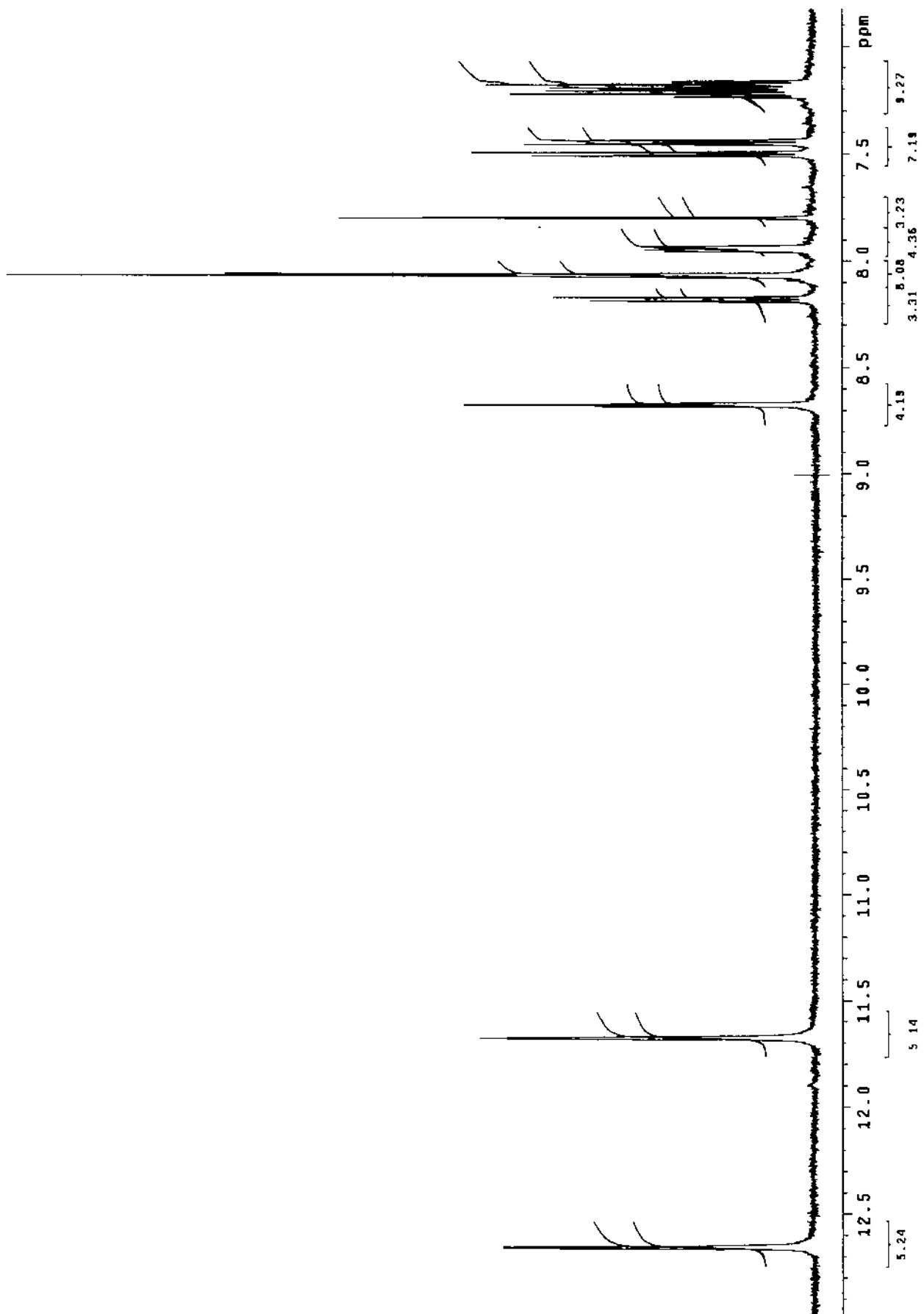


Fig. 3-106. Proton NMR spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D).

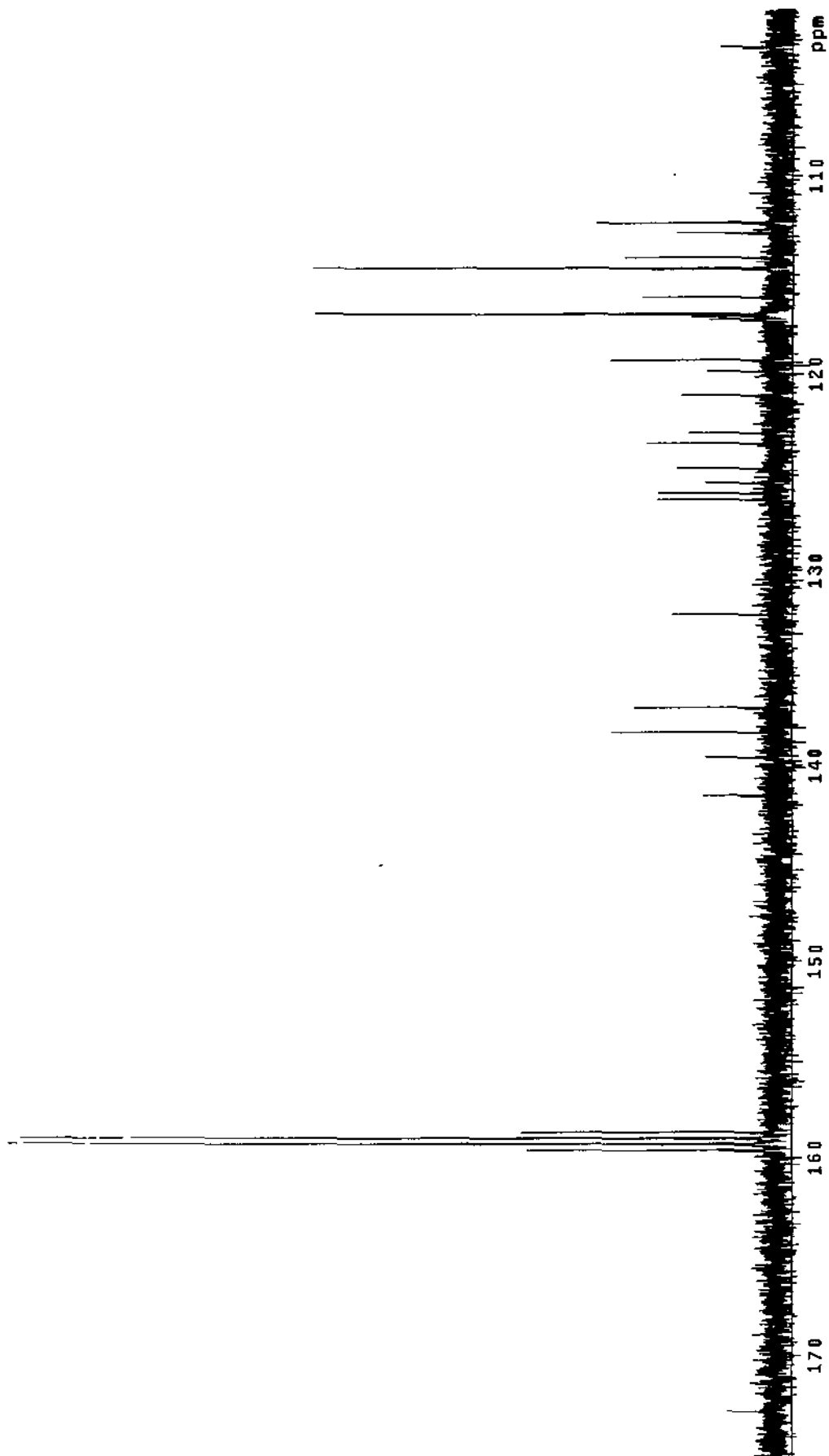


Fig. 3-107. Carbon NMR spectrum of isobromodeoxytopsentin (96J-35-D).

제 5 절 해면 *Stelletta* sp.의 대사물질

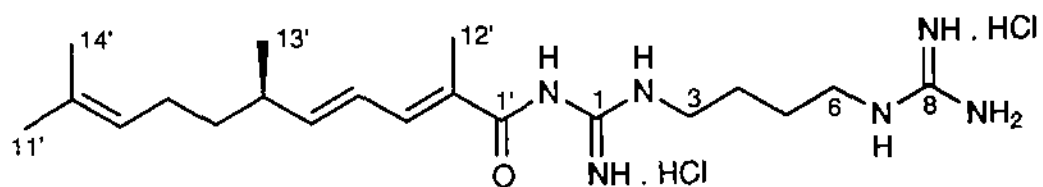
1. 서 론

해면 *Stelletta* sp. (시료번호 96J-12)는 '95년 3월에 서귀포 부근에 위치한 문섬과 차귀도 주변의 수심 10 - 20 m에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 짙은 갈색의 무정형 덩이를 이루고 있는 이 시료의 동정을 전문가에 의뢰 분석한 결과 형태의 일반적인 특징이 *S. grubii* Schmidt와 유사하였다. 그러나 spicule의 종류와 분포에 있어서 *S. grubii*의 type specimens와의 차이점이 적지 않았다. 따라서 본 시료는 종의 명칭이 없이 *Stelletta* sp. (order Astrophorida, family Stellettidae)로만 동정되었다.

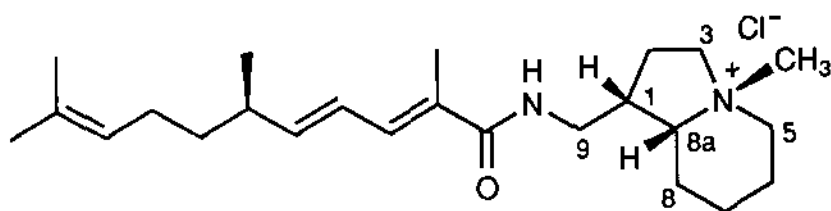
생리활성도 측정 결과 *Stelletta* sp.의 조추출물은 brine-shrimp larvae에 대하여 비교적 강한 독성 LD₅₀ 110 ppm을 나타내었으며 항진균 검색에서도 *Candida albicans*에 대하여 저해 활성(paper disk method: inhibition zone 6 mm)을 나타내었다. 이 시료는 채집된 양은 적으나(260 g wet weight) 외국에서 동일한 속의 해면에 대하여 연구된 바가 거의 없을 뿐 아니라 조추출물의 화학적 특성(¹H NMR, TLC analysis)이 우수하였고 동일한 종의 시료가 연구실에 냉동보관 중이었으므로(시료번호 94K-25: '94년 11월 남해안의 거문도와 백도 해역에서 채집)와 동일하였으므로 두 시료를 합하여(1.1 kg wet weight) 함께 분석하였다.

해면시료는 채집 즉시 현장에서 드라이아이스로 냉동시킨 후 이 상태에서 연구소로 운반하여 냉동고(-25°C)에 보관되었다. 시료를 해빙시킨 후 짙은 시료에 대하여 methanol과 dichloromethane을 수 차례 가하여 유기물질을 추출하였다. 각각의 용매를 증발시킨 후에 합한 조추출물에 대하여 물과 *n*-butanol의 분획을 이용하여 소금과 기타의 염을 제거하였다. Butanol에 용해된 유기물은 *n*-hexane과 10% aqueous methanol의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였으며 aqueous methanol 층은 다시 C₁₈ reversed-phased vacuum flash chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, reversed-phase HPLC 등을 이용하여 2차 대사물질을 분리하였다. 이 과정의 매 단계마다 brine-shrimp에 대한 독성과 ¹H NMR 측정으로 생리활성 물질을 추적하였다.

상기의 방법으로 2종의 alkaloids를 분리하였으며 분광자료의 해석에 의하여 stellettadine A(96J-12-A)와 stellettamide B(96J-12-B)의 구조를 명확히 결정하였다(Fig. 3-108). 문헌자료 조사결과 애석하게도 stellettadine A는 아주 최근에 일본의 Fusetani group에 의하여 일본해역에 서식하는 해면 *Stelletta* sp.로부터 분리된 부착생물 유생의 변태 및 착생 유도제로 발견되었다. 이 사실은 본 연구진이 '96. 2월 미국 Santa Barbara에서 개최된 Gordon Conferences-Marine Natural Products Section에서 구두 발표하기 직전인 '96. 1월에 학술지에 투고한 사실을 직접 확인하였다 (Fusetani



96J-12-A(stelletadine A)



96J-12-B(stelletamide B)

Fig. 3-108. Structures of stelletadine A and stelletamide B.

& Tsukamoto, personal commun.; Tsukamoto, *et al*, 1996). 그러나 본 연구에서 stelletadine A와 함께 분리된 alkaloid stelletamide B는 신물질임을 확인하였다. 아울러 stelletadine A에 대하여 일본에서 보고된 구조에서 명확하지 않았던 부분을 규명하였다. 생리활성 측정 결과 stelletadine A와 stelletamide B는 항진균 효과와 RNA 분해효과가 있음을 확인하였다. 본 연구 결과는 최근 국제학술지인 *Journal of Natural Products*에 게재되었으며(1997, 60, 611-613) 현재 생리활성의 기작에 대한 연구가 외국의 전문연구진에서 진행 중이다(Shin, *et al*, 1997; Hori, personal commun.).

본 연구에서 분리한 천연물 중에서 stelletadine A는 비록 학술지에의 투고시기의 차이로 인하여 외국에서 먼저 보고가 이루어진 물질이나 본 연구진에서 거의 동시에 독자적인 방법으로 그 구조와 생리활성을 규명하였고 당초 발표된 구조에서 미비하였던 부분을 규명하였으므로 여기에서는 stelletamide B와 함께 신물질로 다루어 자세한 분석방법과 그 화학적 특성을 다루기로 한다.

2. Alkaloids의 분리, 구조 결정 및 생리활성

점성을 띤 연한 황색의 반고형 형태로 분리된 물질 96J-12-A의 분자식은 HRMS와 ^{13}C NMR 자료에 의하여 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}$ 로 밝혀졌다(Fig. 3-109 and 3-110). 이 물질의 대단히 큰 극성(수용성)과 분자식에서 나타난 바와 같이 여러 개의 질소 원자가 존재한다는 사실은 96J-12-A이 peptide이거나 혹은 guanidine, urea, creatine 등 multi-nitrogenous 계열의 작용기가 존재한다는 것을 의미하였다. ^{13}C NMR data 상에서 δ 160-150에 여러 개의 signals이 관찰된 사실이 후자의 해석을 지지하였다. IR spectrum 상에서 3400(broad)과 1630 cm^{-1} 에서 나타난 강한 흡광 band는 각각 amine (혹은 hydroxyl)과 amide기의 존재를 드러내었다. 또한 UV(MeOH) spectrum에서 λ max가 장파장인 282 nm에 나타난 것은 multiple-conjugated double bonds가 있음을 나타내었다.

이상의 자료를 토대로 하여 96J-12-A의 개략적인 구조는 ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 NMR 자료의 해석에 의하여 주로 결정되었다(Fig. 3-111 ~ 3-114). 먼저 ^1H NMR spectrum에서 δ 7.22(1H, d, $J = 10.8$ Hz), 6.44(1H, dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz), 6.16(1H, dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz)에 나타난 3개의 선형(sequentially)으로 연결된 signals는 전형적인 conjugated double bonds의 존재를 드러내었다(Fig. 3-111). HMQC spectrum에 의하여 지시된 olefinic carbons의 chemical shifts도 이들이 double bonds에 결합된 수소라는 해석을 지지하였다: δ 152.96(CH), 140.64(CH), 125.29(CH)(Fig. 3-113). 이들 중 탄소 δ 140.64에 결합된 수소의 signal이 δ 7.22로 대단히 downfield shift되어 있는 것은 carbonyl이나 imine 혹은 cyano 등 electron-withdrawing group이 이 methine 탄소의 β - 위치에 결합되어 있는 것으로 해석되었다.

^1H COSY spectrum과 TOCSY 실험으로부터 δ 6.16에 나타난 olefinic signal(1H, dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz)이 δ 2.35(1H, m), 1.40(2H, dt, $J = 7.3, 7.3$ Hz), 1.98(2H, m) 등의 methylene과 methine protons를 순차적으로 거쳐 δ 5.10(1H, br t, $J = 7.1$ Hz)에 나타난 olefinic proton signal에 연결되는 것이 밝혀졌다(Fig. 2-7). 또한 동일한 실험에 의하여 δ 1.98(3H, s), 1.67(3H, s), 1.58(3H, s), 1.06(3H, d, $J = 6.8$ Hz) 등에 위치한 4개의 methyl기도 이 long-chain에 연결되어 있음이 밝혀졌다. 이러한 해석은 HMBC 실험에서 이 들 4개의 methyl 및 전자에서 언급한 여러 olefinic protons와 neighboring carbons 사이에 나타난 20 여 개의 long-range H-C correlations에 의하여 입증되었다(Fig. 3-114, Table 3-4). 또한 δ 7.22 와 1.98에 나타난 protons와 δ 171.30(C)의 carbonyl carbon과의 H-C correlations는 amide(imine or other nitrogenous) carbon이 linear long-chain의 olefinic end에 접합되어 있음을 증명하였다. 이와 같이 stelletadine A(96J-12-A)는 14개의 탄소로 이루어진 linear norsesquiterpenyl carbonyl part를 갖고 있음이 밝혀졌다.

물질 96J-12-A의 norsesquiterpenyl chain에는 3 개의 이중결합이 존재한다. 이 들 중 대칭적인 terminal double bond(C-9')를 제외한 나머지 두 비대칭 bonds(C-2', C-4')의 geometry는 H-H coupling constants와 ^{13}C NMR spectrum에서의 chemical shifts로 결정되었다. 먼저 서로 이웃하는 olefinic protons 간의 대단히 큰 coupling constants($J_{4',5'} = 15.1$ Hz)는 E configuration의 직접적인 증거가 되었으며 C-2' 이중결합에 접합된 C-12'의 upfield shift(δ 17.85) 역시 E configuration을 지시하였다(Kalinowski, et al 1988; Breitmaier & Voelter, 1989). 따라서 stelletadine A는 2'E,4'E geometry를 가진 side-chain을 보유하고 있다.

물질 96J-12-A를 이루는 20 개의 탄소원자들 중에서 전기한 norsesquiterpenyl part에 속하지 않는 것은 ^{13}C NMR spectrum에서 δ 158.58(C), 155.68(C), 42.21(CH₂), 42.01(CH₂), 27.11(CH₂), 26.89(CH₂) 등에 나타난 6 개의 탄소들이다. 이들의 chemical shifts와 carbon multiplicities는 각각 대단히 유사한 세 개의 쌍으로 이루어져 있으므로 거의 symmetric한 하나의 C₆ linear unit가 존재함을 알 수 있었다. ^1H decoupling 실험과 ^1H COSY spectrum 에서도 δ 3.78(2H, t, $J = 6.4$ Hz), 3.24(2H, t, $J = 6.6$ Hz), 1.72(4H, m) 등 위에서 언급한 C₆ unit의 methylenes에 해당하는 수소 signals가 일련의 isolated spin system 즉 -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-를 이루고 있음을 명확히 보여주었다(Fig. 3-111 and 3-112). ^1H NMR data에서 이 spin system의 양 쪽 termini에 해당하는 methylene protons의 낮은 chemical shifts(δ 3.78, 3.24)와 splitting pattern(triplet)은 이들이 heteroatoms 이나 electron-withdrawing group에 연결되어 있음을 드러내었다. 이러한 정보와 δ 158.58 및 155.68에 나타난 quaternary carbons의 낮은 chemical shifts, 이 물질의 분자식에서 드러난 6개의 질소원자 등의 정보를 종합적으로 분석한 결과 이 들 모두를 만족시킬 유일한 해석은 두 개의 guanidine groups의 존재 뿐이었다. 따라서 96J-12-A는 하나의 C₆ linear bisguanidino unit를 갖고 있음

Table 3-4. Proton and carbon NMR assignments for stelletadine A.

#	H	C	HMBC (8 Hz)
1		158.58	
2*	3.24 (2H, t, 6.6)		1
3	1.72 (2H, m)	42.01	1, 4
4		27.11	3, 6
5	1.72 (2H, m)	26.89	3, 6
6	3.78 (2H, t, 6.4)	42.21	5, 8
7*			
8		155.68	
1'		171.30	
2'		127.37	
3'	7.22 (1H, d, 10.8)	140.64	1', 5', 14'
4'	6.44 (1H, dd, 15.1, 10.8)	125.29	5', 6'
5'	6.16 (1H, dd, 15.1, 8.3)	152.96	3', 4'
6'	2.35 (1H, m)	38.51	
7'	1.40 (2H, dt, 7.3, 7.3)	37.82	
8'	1.98 (2H, m)	26.39	
9'	5.10 (1H, br t, 7.1)	125.27	11', 12'
10'		132.46	
11'	1.67 (3H, br s)	25.90	9', 10', 12'
12'	1.58 (3H, br s)	17.85	9', 10', 11'
13'	1.06 (3H, d, 6.8)	20.53	5', 6'
14'	1.98 (3H, br s)	12.37	1', 2', 3'

Proton and carbon NMR data were measured in CD₃OD solutions at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H COSY, TOCSY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments. *Positions of nitrogens of guanidinium groups.

을 알 수 있었다. 이 sub-unit의 존재는 downfield carbons와 methylene protons와의 HMBC correlation(C-1과 H-2 및 H-3; C-8과 H-6)으로 증명되었다.

물질 96J-12-A를 이루는 두 부분구조인 bisguanidino group과 전기한 linear norsesquiterpenyl part와의 연결은 HMBC 등 NMR 분광자료에 의하여 직접 증명된 것은 아니나 ²⁻³J 6~9 Hz 로 최적화 시킨 HMBC 실험에서 상관관계가 나타나지 않았음. 이 천연물의 분자식으로 미루어 부분구조간의 결합은 필연적이었다. 또한 UV spectrum에서 강한 흡광 maximum이 282 nm에 나타나 일반적인 α,β,γ,δ, -unsaturated amide(~ 260 nm) 보다 훨씬 장파장으로 이동되어 있다는 점도 additional chromophore 즉 guanidine

이 C-1'의 unsaturated carbonyl에 직접 결합되어 있음을 의미하였다. 이리하여 물질 96J-12-A는 norsesquiterpenyl part와 C₆ bisguanidino unit가 결합된 독특한 형태의 alkaloid로 구조가 결정되었다(Fig. 3-108). 전기한 바와 같이 96J-12-A는 이 연구와 거의 같은 시기에 일본근해에서 채집된 해면 *Stelletta* sp.의 대사물질로 보고된 stellettadine A와 동일한 물질인 것이 분광자료의 직접적인 비교와 보고된 논문에 의하여 증명되었다(Fusetani & Tsukamoto, personal commun.; Tsukamoto, et al, 1996).

Stellettadine A에 대하여 발표된 논문에 따르면 이 천연물의 guanidine 기가 free amine 대신에 guanidinium의 형태로 존재하는 것으로 보고되었다. 수서생물로부터 분리된 이 물질의 큰 극성(수용성)으로 미루어 guanidinium salt의 존재는 충분한 근거를 갖고 있다. 그러나 그들의 논문에는 organic salt에 필수적으로 따르는 counterion에 대하여는 보고가 되지 않았다. 뿐만 아니라 동일한 연구진(동경대의 Fusetani group)에서 stellettadine A와 비슷한 시기에 보고한 천연물 stellettamide A의 경우에는 counterion으로 phosphate(H₂PO₄⁻)를 보고한 예가 있으나 이것은 그들이 charge를 띤 물질을 효과적으로 분리하기 위하여 사용한 방법인 ion exchange chromatography에서 용출액으로 약산성의 phosphate buffer를 천연에 존재하는 counterion과 phosphate 등 negative ion간의 교환현상의 결과일 뿐으로 해양천연물이 자연상태에서 phosphate ion을 갖고 있다는 것은 대단히 믿기 어렵다(Hirota, et al, 1990). 이 문제를 해결하기 위하여 본 연구팀에서는 scanning electron microscope (SEM)을 이용하여 energy dispersive spectroscopy(50 KeV) 실험을 하였다. 그 결과 counter anion으로서 chloride가 존재함이 드러났다. 따라서 stellettadine A(96J-12-A)는 norsesquiterpenyl bisguanidinium dichloride로 구조가 최종적으로 밝혀졌다. Bisguanidinium unit를 가진 물질은 해양천연물 중에서 상당히 드물게 발견되어 그 수는 10 종 미만이나 생물에 따른 분포는 비교적 광범위하여 플라크톤, 방선균, 해면, 강장동물 등으로부터 보고된 바가 있다(Faulkner, 1996; 1997).

Stellettadine A와 함께 본 연구진에 의하여 stellettamide B(96J-12-B)로 명명된 노란색의 반고형(gum) 물질이 분리되었다. 이 물질의 분자식은 고해상 질량분석과 ¹³C NMR 자료에 의하여 C₂₄H₄₁N₂O로 결정되었다(Fig. 3-115 and 3-116). 이 물질의 ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, IR, UV등 기본적인 분광자료는 stellettadine A와는 상당히 달라서 두 물질 사이의 구조적인 차이점이 큰 것을 알 수 있었다. 먼저 ¹³C NMR data에서 aliphatic region에 수소가 접합된 탄소 signals가 4개나 더 많이 존재하였다. ¹H NMR spectrum에서도 methyl기가 하나 더 많이 발견되었으며(δ 3.14, 3H, s) δ 4.0-3.0 region에 복잡하게 splitting되는 여러 개의 수소 signals가 나타났다(Fig. 3-117). 물질 96J-12-A의 IR spectrum에서 1630 cm⁻¹에 나타났던 강한 absorption band가 96J-12 B에서는 1650 cm⁻¹로 변화한 것은 전자에 존재하던 guanidine group이 일반적인 amide로 변화한 것을 의미하였다. 또한 UV spectrum 상에서도 absorption maximum이 약 20 nm 정도 단파장으로 이동되어 있음이 발견되었다. 마지막으로 질량분석에서도 질소

원자의 수가 stelletadine A에 비하여 4개나 감소한 것이 드러났다. 그러므로 96J-12-B는 구조적으로 stelletadine A와는 매우 다른 계열에 속하는 물질임이 분명하였다.

이 물질은 ^1H COSY, TOCSY, HMQC, HMBC 등 2D NMR 자료의 해석에 의하여 새로운 alkaloid로 구조가 결정되었으며 입체구조도 NOESY 자료의 해석과 함께 탄소간의 이중결합에 대한 유기분해 반응에 의하여 완전히 규명되었다(Fig. 3-118~3-120). 먼저 HMQC 실험에 의하여 이 물질에 존재하는 모든 수소와 수소가 접합된 탄소가 정확히 지정되었다. ^1H NMR spectrum에서 나타난 네 개의 olefinic signals는 ^1H COSY 실험에 의하여 하나의 disubstituted double bond와 두 개의 trisubstituted double bonds로 결정되었다: δ 6.83(1H, br d, $J = 11.2$ Hz), 6.35(1H, ddd, $J = 15.1, 11.2, 1.0$ Hz), 5.90(1H, dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz), 5.09(1H, br t, $J = 7.1$ Hz). 이 들 중에서 δ 6.80, 6.35, 5.90 등에 위치한 세 개의 signals는 서로 직접 연결되어 있음이 proton decoupling과 ^1H COSY 실험으로 밝혀졌다(Fig. 3-118). 또한 이 들 네 개의 olefinic protons와 upfield protons 간의 직접적인 연결관계도 ^1H COSY 실험으로 규명되었으며 이 들이 포함된 각각의 spin system 간의 연결은 TOCSY 실험으로 가능하였다. 특히 δ 6.83(1H)와 1.03(3H), δ 5.90(1H)와 1.92 (3H), δ 2.28(1H)와 5.09(1H), δ 1.67 (3H)와 1.03(3H) 등에 위치한 signals를 양쪽 끝으로 하는 여러 correlations의 발견은 물질 96J-12-B가 하나의 긴 chain으로 이루어진 부분을 포함하고 있음을 드러내었다. 이 long-chain에 존재하는 3 개의 methyl 기의 위치는 이들의 수소 signals와 인접한 탄소 signals간에 나타난 여러 개의 HMBC correlations에 의하여 각각 C-2', C-6', C-9'로 결정되었다. 마찬가지로 δ 172.37에 나타난 carbonyl carbon의 위치도 H-3' (δ 6.83) signal과의 3-bond H-C correlation에 의하여 C-1'로 지정되었다. 이로서 물질 96J-12-B에는 96J-12-A와 같은 linear norsesquiterpenyl chain이 존재함이 밝혀졌다 (Table 3-5).

Stelletamide B의 side-chain에는 두 개의 비대칭 이중결합(C-2', C-4')와 하나의 비대칭 탄소중심(C-6')이 존재한다. 이 들 중에서 C-2'의 geometry는 C-12'의 chemical shift (δ 12.94)와 H-3'~H-5' 및 H-4'~H-13'의 signals 사이에 나타난 강한 NOESY correlations에 의하여 E로 지정되었으며 C-4' 이중결합의 geometry도 ^1H spectrum에서의 큰 vicinal coupling constant($J_{4,5} = 15.1$ Hz)에 의하여 E로 결정되었다. C-6' 비대칭중심의 absolute configuration은 화학반응과 GC 분석으로 결정되었으며 뒤에 다룬다.

물질 96J-12-B를 이루는 나머지 부분의 구조 역시 2D NMR 실험에 의하여 규명되었다. 비록 ^1H NMR spectrum에서 upfield signals의 상당수가 부분적으로 중첩되어 있기는 하였으나 ^1H COSY와 HMQC 실험 결과의 효과적인 결합으로 NMR data 상에서의 모든 signals의 지정이 가능하였으며 아울러 nitrogen이 bridge-head에 위치하는 하나의 [5.6]-bicyclic system의 존재가 규명되었다. 이 해석을 지지하는 주요한 증거는 TOCSY

실험에서 H-3 α (δ 3.90)~H-8a (δ 3.67), H-3 α and -3 β (δ 3.90 and 3.28)~H-9 (δ 3.44), H-5 α (δ 3.58)~H-8a (δ 3.67) 등 여러 개의 공간적으로 멀리 떨어진 위치의 수소 signals를 함께 포함하는 H-H correlations가 다수 발견된 것이다. 또한 HMBC 실험에서 H-3, H-8a, H-9 등의 수소와 인접한 탄소와의 H-C correlations이 다수 나타난 것도 이러한 해석을 지지하였다(Fig. 3-120). 마지막으로 ^1H NMR spectrum에서 나타난 하나의 독립된 methyl기 (δ 3.14, 3H, s)는 ^{13}C NMR data에서의 특징적인 chemical shifts (δ 54.30)와 C-3, C-5, C-8a 등과의 HMBC correlations로 bridge-head nitrogen에 결합되어 있음이 밝혀졌다. 이리하여 stelletamide B를 이루는 부분구조는 N-methyl indolizidinim과 norsesquiterpene으로 결정되었다.

이 들 두 부분구조 사이의 연결은 HMBC correlations(*i. e.*, H-9~C-1')에 의하여 직접 규명되지는 못 하였다. 이 것은 아마도 이들 간의 J values가 일반적인 HMBC 실험에서 측정이 가능한 범위를 초과하기 때문으로 해석된다. 그러나 H-9 signals의 낮은 chemical shifts(δ 3.44, 3.32)와 물질의 분자식에 대한 고려는 두 개의 부분구조가 하나의 amide bond로 연결되어 있음을 나타내었다. 물질 96J-12-B에서 전기한 바와 같이 quaternary ammonium(N-4) ion의 발견은 counterion의 존재를 의미하였다. 이 ion은 SEM을 이용한 energy dispersive spectroscopy에 의하여 chloride로 규명되었다.

Stelletamide B의 indolizidine 부분은 C-1, N-4, C-8a 등 세 위치에 비대칭 중심을 갖고 있다. 이 들의 입체배열은 NOESY 실험으로 규명되었다. N-CH₃ 수소의 signal은 H-3 β (δ 3.28) 및 H-5 β (δ 3.40)과 강한 상관관계를 나타내었다. 또한 동일한 실험에 의하여 H-1 (δ 3.16)과 H-9 (δ 3.44, 3.32) 간의 공간적인 근접함이 밝혀졌다. 그러나 ^1H NMR spectrum에서 각 signals의 chemical shifts가 너무 인접하였으므로 indolizidine의 입체구조 결정에 있어서 가장 중요한 부분인 H-1, H-8, N-CH₃ 간의 공간적인 상관관계는 불명확 하였다. 이 문제를 해결하기 위하여 NMR 용매를 acetone- d_6 로 바꾸어 동일한 NOESY 실험을 행한 결과 이 들 세 수소 signals 상호 간의 mutual correlations가 발견되었다: in acetone- d_6 , δ 3.56, 4.10, and 3.37 for H-1, H-8a, and N-CH₃, respectively. 이리하여 indolizidine에 존재하는 비대칭 중심의 상대적 입체배열은 1S⁺, 4S⁺, 8aR⁺로 결정되었다.

물질 96J-12-B에는 indolizidine 외에도 side-chain의 C-6'에 하나의 비대칭 탄소 중심을 갖고 있다. 이 탄소의 절대 입체배열(absolute configuration)은 유기화학적 산화 분해반응에 의한 2-methylglutaric acid의 생성으로 규명되었다(Carlsen, *et al.*, 1981). 물질 96J-12-B를 RuCl₃·xH₂O 촉매 하에서 NaIO₄와 반응시켜 2-methylglutaric acid를 합성하였다. 이 물질의 ^1H NMR spectrum은 표준 물질과 완전히 일치하였으며 GC 분석의 결과도 동일하였다. 또한 합성물의 optical rotation($[\alpha]_D^{25} +17.5^\circ$)도 (S)-2-methylglutaric acid에 대하여 알려진 값(+22°)과 거의 일치하였다. 이리하여 신물질 stelletamide B(96J-12-B)는 indolizidine과 norsesquiterpenyl amide 가 결합된 alkaloids로 그 구조가 완벽히 결정되었다(Fig. 3-108).

해양생물로부터 보고된 alkaloids는 무수히 많으나 bicyclic indolizidine으로 구성된 물질은 거의 발견되지 않는다(Faulkner, 1996; 1997). STN database와 년차 종설 논문들을 중심으로 하여 조사한 결과 10,000 여에 달하는 기존의 해양천연물 중에서 indolizidine계 alkaloids로는 수 년전 일본근해의 해면 *Stelletta*로부터 분리된 stellettamide A와 원색동물 *Clavelina picta*로부터 piclavines가 있을 뿐이다(Hirota, et al, 1990; Raub, et al, 1992). 그러나 두 천연물 모두 stellettamide B와는 구조적으로 상당히 달라 본 연구에서 발견한 물질의 신규성을 높여주고 있으며 생리활성 여부도 큰 관심이 모아지고 있다.

문헌조사에 의하면 본 연구에서 분리된 물질 중에서 stellettadine A는 원래 저서 해양생물의 부착유도 및 억제제(antifouling agents)를 개발하는 과정(Husetani Biofouling Project)에서 발견되었으며 ascidian *Halocynthia roretzi* 유충의 변태와 부착을 유도하는 활성이 있는 것으로 밝혀졌다(ED_{50} 50 $\mu\text{g/mL}$). 또한 이 과정에서 함께 분리된 stellettamide A - 이 때는 이미 신물질이 아님 - 는 세포독성과 항진균 효과가 있음이 보고되었다(Hirota, et al, 1990; Tsukamoto, et al, 1996). 본 연구에서는 paper-disk 방법을 이용하여 항진균 활성을 측정한 결과 stellettadine A(96J-12-A)와 stellettamide B(96J-12-B)는 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 진균 *Candida albicans*에 대하여 약한 저해활성(inhibition zone 4 and 9 mm for 96J-12-A and -B, respectively).

한편 stellettadine A와 stellettamide B의 생리활성 검색과정에서 대단히 흥미로운 사실이 발견되었다. 바이러스의 증식을 위한 필수효소인 reverse transcriptase (RT)에 대한 저해활성을 조사하기 위한 agarose-gel 전기영동 실험에서 이들 천연물이 template로 이용한 RNA를 완전히 분해시켰으며 그 결과 RT에 대한 저해활성의 측정이 전혀 불가능하였다. 이 현상을 구체적으로 규명하기 위하여 순수한 rRNA와 mRNA에 대한 분해효과를 측정한 결과 두 물질 모두가 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 single-과 double-stranded RNA를 완전히 분해시켰다(Shin, et al, 1997).

현재 신물질 stellettamide B의 생리활성에 대하여는 Ca^{++} channel의 modulating effect와 calmodulin과의 결합성에 대한 연구가 일본 동경대학교 약학대학에서 진행 중이다(Hori, personal commun.). 또한 미국의 국립 암연구소(NCI)에서 60-channel test 를 이용하여 이 물질의 항암효과를 검색하고 있다.

3. 실험방법

가. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

해면 *Stelletta* sp. (시료 번호 96J-12)는 '95년 3월에 서귀포 근해 문섬과 차귀도 주변의 수심 10-20 m에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 시료의 동정을 해면분류의 국내권위자인 한남대학교의 심정자 교수에게 의뢰한 바 그 소견은 다음과 같다: "This sponge was massive(2-cm thick), and the color was dark brown. The specimens were firm and slightly compressible. The skeleton was formed with large oxea (780-1250 x 15-32 μm) and plagiotriaene(450-750 x 20-48 μm) arranged compactly at the sponge surface, large oxyaster(30-50 μm in diameter), and small oxyaster (7.5-20 μm in diameter). This sponge was similar to *Stelletta grubii* Schmidt in its spicule type. however, our specimens had shorter megascleres than *S. grubii* (oxea 2000-2200 x 60 μm , plagiotriaene 1200 x 60 μm). In addition, large and small oxyasters had microspines at the end of the sharply pointed ray"(Hoshino, 1981; Shin, et al, 1997). 현재 이 시료는 한남대학교 자연사박물관의 해면동물 수집관에 보존(등록번호 Por. 26) 중이다.

채집한 시료는 현장에서 dry ice로 급속 냉동시킨 후 이 상태에서 연구소로 운반하여 냉동고(-25°C)에 보관되었다. 이 시료는 생물학적인 분류와 조추출물에 대한 화학적 특성분석(¹H NMR, TLC)의 결과가 본 연구진에서 보관중인 기존의 시료(94K-25; '94년 8월 거문도 해역에서 채집)와 동일하였으므로 두 시료를 합하여 함께 분석하였다. 시료를 상온에서 해빙시킨 후(중량 1.1 kg) 3 L 용량의 비이커에 넣고 methanol(2 L x 3)과 CH₂Cl₂(2 L x 3)을 순차적으로 반복하여 가하여 유기물질을 추출하였다. 용매를 증발시킨 후 합한 조추출물(29.1 g)에 대하여 물(1 L)과 *n*-butanol(1 L x 2)의 분획을 이용하여 소금과 기타의 수용성 염을 제거하였다. Butanol(6.46 g) 층에 대해서는 용매를 감압 증류한 뒤 다시 *n*-hexane(500 mL)과 10% aqueous methanol(500 mL x 2)의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였다(*n*-hexane: 2.71 g, aqueous methanol: 3.72 g). 각각의 분획에 대한 생리활성 측정 결과 aq. methanol층이 brine-shrimp larvae에 대한 강한 활성(LD₅₀ 101 ppm)을 나타내었다. Aq. methanol층은 dry methanol과 acetone을 이용하여 TLC grade의 ODS silica에 흡착시킨 후 reversed-phase vacuum flash chromatography(5 cm x 6 cm, YMC ODS-A 60-125 gel 400 mesh)를 하였다. Chromatography를 위한 용매는 methanol과 물의 혼합액으로서 50% aqueous methanol로부터 시작하여 100% methanol에 이르기까지 10% 씩 methanol의 양을 증가시키고 마지막으로 100% EtOAc로 세척하는 gradient system을 이용하였다(총 7개 분획). 각각 300 mL 씩의 용매로 용출하여 얻은 분액을 감압 건조한 뒤 각 분획 별로 잔류물의 중량과 ¹H NMR spectrum을 측정하였다. 이 결과 20-10% aqueous methanol로 용출한 분액

(fraction 4와 5)에 이차대사물질이 함유되어 있음을 확인하였다.

나. 천연물의 분리

이차대사물질이 함유된 분획 4와 5(20-10% aq. MeOH)를 합하여 저온에서 감압 증류를 하였다. 남은 고체물질(0.89 g)을 methanol에 녹인 뒤 lipophilic Sephadex column chromatography(LH-20, 2 cm x 50 cm, 100% methanol)를 하였다. 총 41개의 분획(5 mL)을 얻은 뒤 각각의 분획에 대하여 TLC와 ^1H NMR 자료분석을 하여 천연물이 함유된 분획을 모은 뒤 용매를 감압 건조하였다. 잔류한 노란색의 겔형 반고형 물질(0.65 g)을 45% aqueous methanol에 녹인 후 C_{18} Sep-pak column(Alltech, 1 cm x 1.5 cm)을 통과시켜 비극성 불순물을 제거하였다. 용출액을 C_{18} reversed-phase HPLC(45% aq. methanol, Shiseido Capcell ODS column, 1 cm x 25 cm, Shodex RI detector, 1.5 ml/min)를 한 결과 retention time 17 min(stellettadine A: **96J-12-A**)와 31 min(stellettamide B: **96J-12-B**)에서 천연물이 분리되었다. 이들에 대한 최종 정제는 C_{18} reversed-phase HPLC(35% aq. methanol, YMC ODS H-80 column, 1 cm x 25 cm, Shodex RI detector, 1.3 ml/min)로 이루어졌다. 최종적으로 분리 정제된 물질의 양은 stellettadine A가 78.7 mg이었으며 stellettamide B는 106.5 mg 이었다.

Stellettadine A(96J-12-A): a yellow gum: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -25.3° (c0.4, CHCl_3); UV (MeOH) λ max (log ϵ) 282 (4.02) nm; IR (KBr) 3400 (broad), 2960, 1630, 1460, 1380, 1250, 1100, 980 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 7.22 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-3'), 6.44 (1H, dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, H-4'), 6.16 (1H, dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz, H-5'), 5.10 (1H, br t, $J = 7.1$ Hz, H-9'), 3.78 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-6), 3.24 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-3), 2.35 (1H, m, H-6'), 1.98 (2H, m, H-8'), 1.98 (3H, s, H-14'), 1.72 (4H, m, H-4, -5), 1.67 (3H, s, H-11'), 1.58 (3H, s, H-12'), 1.40 (2H, dt, $J = 7.3, 7.3$ Hz, H-7'), 1.06 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-13'); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.30 (C, C-1'), 158.58 (C, C-1), 155.68 (C, C-8), 152.96 (CH, C-5'), 140.64 (CH, C-3'), 132.46 (C, C-10'), 127.37 (C, C-2'), 125.29 (CH, C-4'), 125.27 (CH, C-9'), 42.21 (CH_2 , C-6), 42.01 (CH_2 , C-3), 38.51 (CH, C-6'), 37.82 (CH_2 , C-7'), 27.11 (CH_2 , C-4), 26.89 (CH_2 , C-5), 26.39 (CH_2 , C-8'), 25.90 (CH_3 , C-11'), 20.53 (CH_3 , C-13'), 17.85 (CH_3 , C-12'), 12.37 (CH_3 , C-14'); HMBC correlations (optimized for 7 Hz) H-3/C-1, C-4; H-4(-5)/C-3, C-5; H-6/C-5; H-3'/C-1', C-5', C-14'; H-4'/C-6'; H-11'/C-9', C-10', C-12'; H-12'/C-9', C-10', C-11'; H-13'/C-5', C-6', C-7'; H-14'/C-1', C-2', C-3'; HRFABMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z observed 377.3012 (calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}$, 377.3029).

Stellettamide B (96J-12-B): a yellow gum: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -24.2° (c0.5, CHCl_3). UV

(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 262 (4.20) nm; IR (KBr) 3450 (broad), 2930, 1650, 1535, 1450, 1380, 975 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 6.83 (1H, br d, $J = 11.2$ Hz, H-3'), 6.35 (1H, ddd, $J = 15.1, 11.2, 1.0$ Hz, H-4'), 5.90 (1H, dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz, H-5'), 5.09 (1H, br t, $J = 7.1$ Hz, H-9'), 3.90 (1H, ddd, $J = 11.7, 11.7, 7.3$ Hz, H-3), 3.67 (1H, m, H-8a), 3.58 (1H, br d, $J = 13.5$ Hz, H-5), 3.44 (1H, dd, $J = 13.2, 7.3$ Hz, H-9), 3.40 (1H, ddd, $J = 13.5, 13.2, 3.9$ Hz, H-5), 3.32 (1H, dd, $J = 13.2, 6.9$ Hz, H-9), 3.28 (1H, m, H-3), 3.16 (1H, m, H-1), 3.14 (3H, s, 4-Me), 2.40 (1H, m, H-2), 2.28 (1H, m, H-6'), 2.00 (2H, m, H-2), 1.94 (3H, m, H-8), 1.92 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-12'), 1.89 (1H, m, H-6), 1.85 (1H, m, H-6), 1.67 (3H, br s, H-11'), 1.59 (1H, m, H-8), 1.58 (3H, br s, H-14'), 1.53 (1H, br d, $J = 13.2$ Hz, H-7), 1.36 (2H, m, H-7'), 1.03 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-13'); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 172.37 (C, C-1'), 148.52 (CH, C-5'), 135.62 (CH, C-3'), 132.32 (C, C-10'), 129.05 (C, C-2'), 125.41 (CH, C-9'), 125.39 (CH, C-4'), 73.96 (CH, C-8a), 61.05 (CH₂, C-5), 57.56 (CH₂, C-3), 54.30 (CH₃, 4-Me), 40.52 (CH, C-1), 40.14 (CH₂, C-9), 38.30 (CH, C-6'), 38.03 (CH₂, C-7'), 26.89 (CH₂, C-8'), 25.90 (CH₃, C-11'), 25.14 (CH₂, C-2), 23.29 (CH₂, C-8), 21.63 (CH₂, C-7), 21.09 (CH₂, C-6), 20.83 (CH₃, C-13'), 17.84 (CH₃, C-14'), 12.94 (CH₃, C-12'); HMBC correlations (optimized for 7 Hz) H-3/C-2, 4-Me: H-8a /C-2, C-3; H-9/C-1, C-2, C-8a; 4-Me/C-3, C-5, C-8a: H-3'/C-1', C-5', C-12'; H-4'/C-2', C-3', C-6'; H-5'/C-3', C-7', C-13'; H-6'/C-4', C-5', C-7', C-8', C-13'; H-12'/C-2', C-3'; H-14'/C-9', C-10', C-11'; H-13'/C-5', C-6'; HRFABMS [$\text{M}+\text{H}$]⁺ observed 373.3210 (calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}$, 373.3219).

다. Oxidative cleavage of stelletamide B.

마그네틱 교반기가 장치된 10 mL 구형 플라스크에 CCl_4 (1 mL), CH_3CN (1 mL), water (1.5 mL) 및 물질 96J-12-B (6.6 mg, 0.016 mmol), NaIO_4 (41.3 mg, 0.192 mmol)을 차례로 넣었다. 이 이상(biphasic) 혼합체에 다시 $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (21.5 mg, 0.104 mmol)을 가한 후에 상온에서 2 시간 동안 빠르게 교반하였다. 용매와 휘발성 물질을 감압 증류하여 제거한 뒤 잔류물에 MeOH (5 mL)을 가한 후 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. Methanol을 감압 증류한 뒤 남은 갈색의 물질을 reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 1 x 25 cm, 5% aqueous MeOH, 2 mL/min)로 분리한 결과 (-)-2-methylglutaric acid (1.1 mg, 48% yield)가 얻어 졌으며 이 물질의 실체는 authentic sample (Aldrich)와의 ^1H NMR spectrum의 비교에 의하여 증명되었다. (-)-2-methylglutaric acid: colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +15.5^\circ$ (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD) δ 2.45 (1H, m, H-2), 2.32 (2H, m, H-4), 1.89 (1H, m, H-3), 1.72 (1H, m, H-3), 1.16 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 2-Me).

가수분해로 얻어진 2-methylglutaric acid의 구조적 확인은 gas chromatographic

analysis에 의하여 증명되었다. 반응의 결과로 얻어진 물질을 5% HCl/MeOH 용액 1 mL에 녹이고 밤새 방치한 후 GC 분석을 한 결과 (+)-dimethyl-2-methyl-glutarate가 retention time 4.355 min에서 검출되었다. 한편 authentic (+)-2-methyl glutaric acid(Aldrich)로부터 동일한 과정에 의하여 얻어진 반응물은 retention time 4.357 min에서 분리되었다. 또한 합성물과 표준물을 합하여 동일한 GC 분석을 한 결과 하나의 peak가 retention time 4.339 min에서 검출되었다. GC 분석을 위하여 사용한 기기는 Hewlett-Packard HP 5890II gas chromatograph 이었으며 column은 ω -wax-320 capillary column(0.32 mm x 300 mm), 온도 조건은 injector, detector, oven에 대하여 각각 280, 280, 180 °C 이었다.

File:7109614 Ident:1_12 Mer Def 0.25 Acq:10-JUL-1996 14:11:23 +1:10 Cal:7109601_1
ZAB-SE4F FAB+ Magnet BpM:154 BpI:2331063 TIC:24312606 Flags:HALL
File Text:Shin (Kordi) 94K-25-B MEOH/NBA

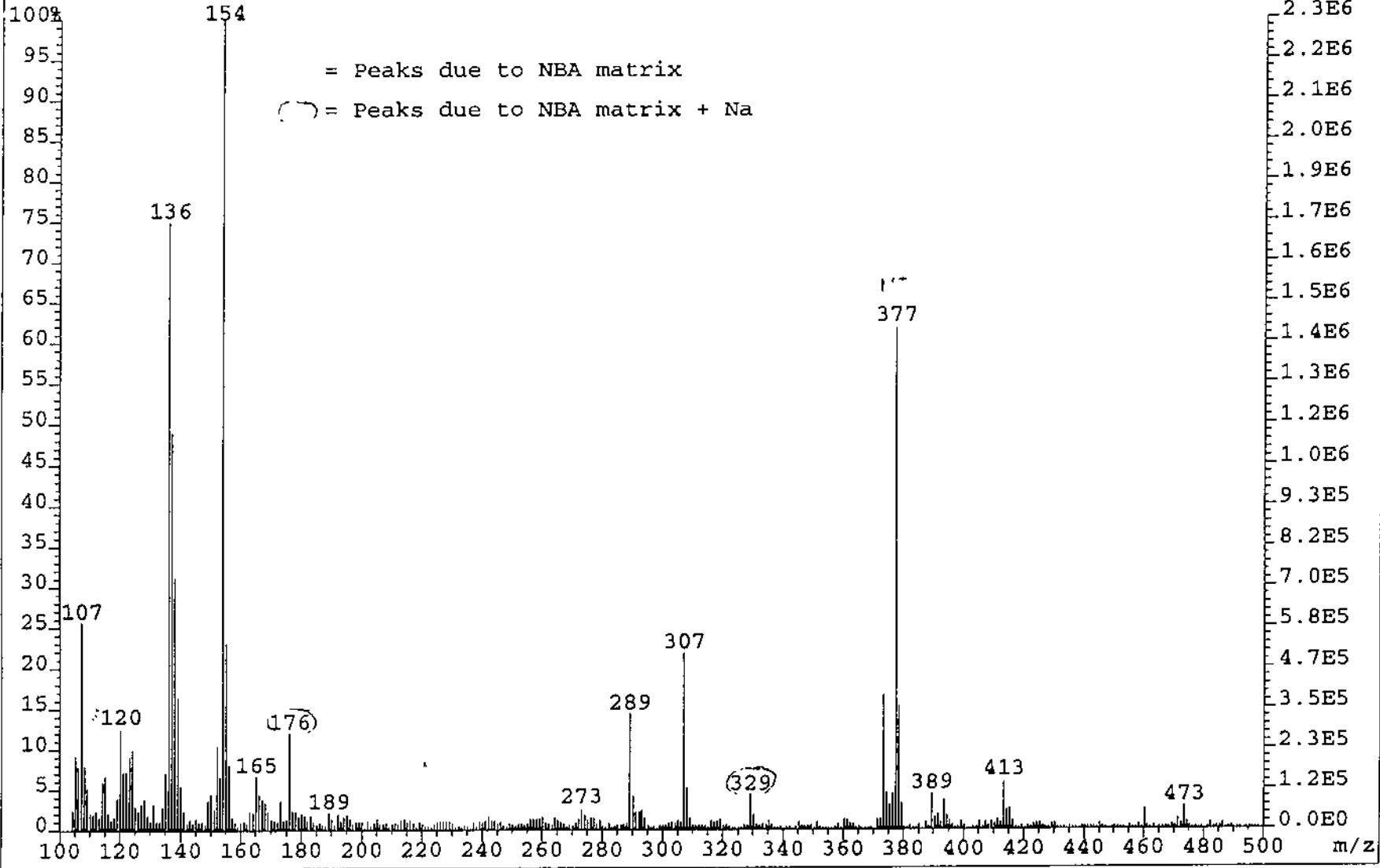


Fig. 3-109. HRMS spectrum of stellatadine A(96J-45-A).

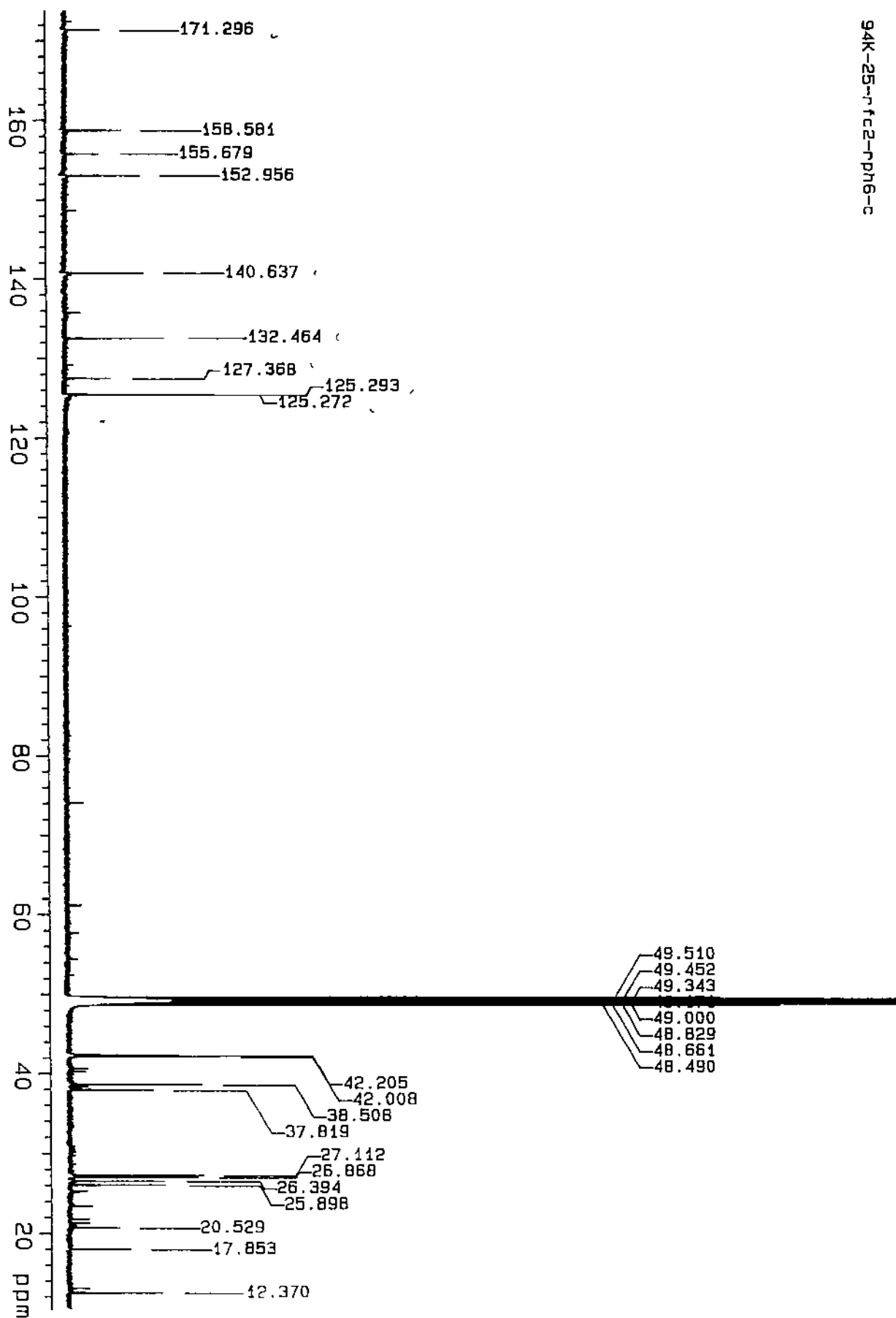


Fig. 3-110. Carbon NMR spectrum of stellettadine A(96J-45-A).

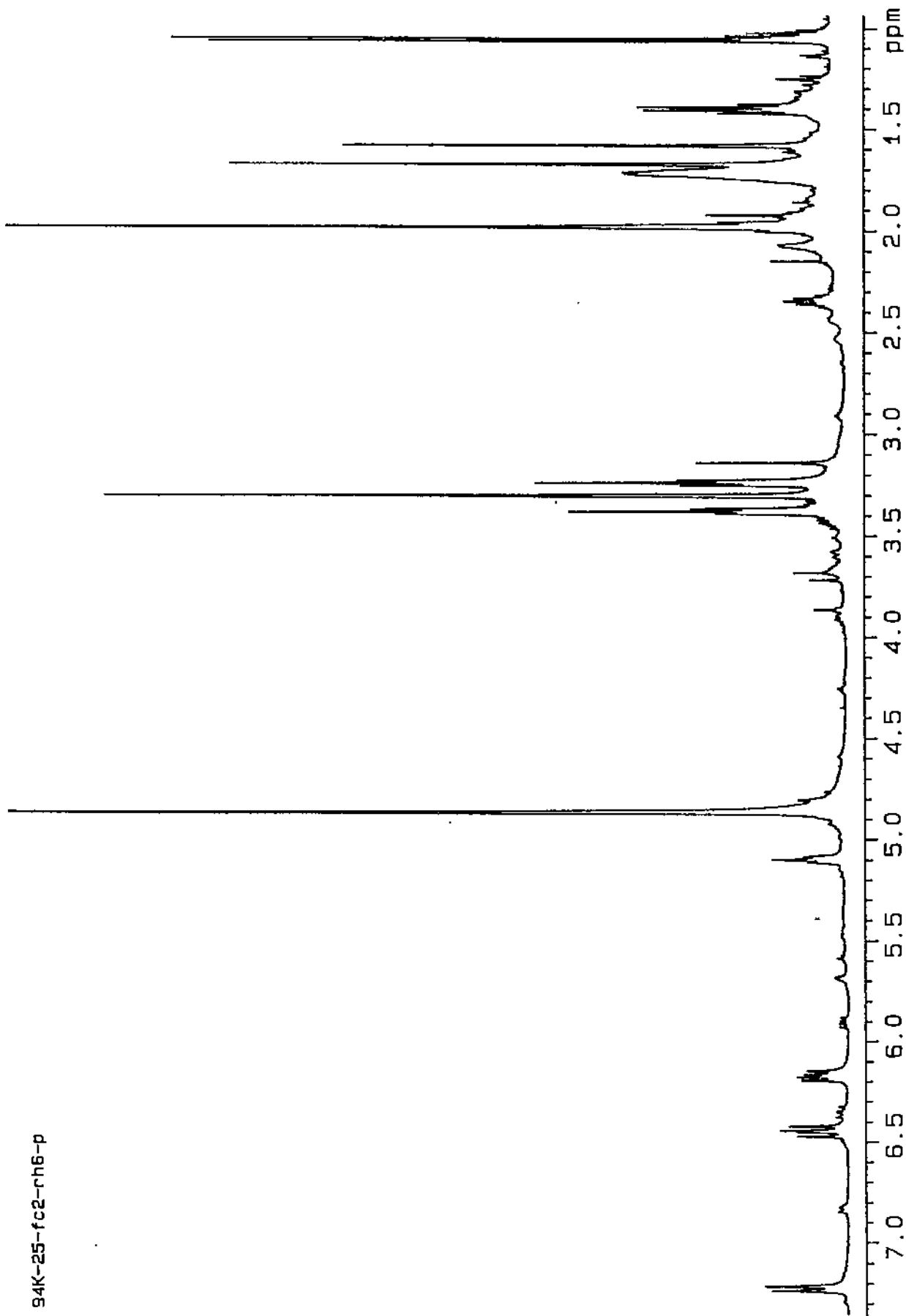


Fig. 3-111. Proton NMR spectrum of stelletadine A(96J-45-A).

94K-25-rfc2-rph6-dqcosy

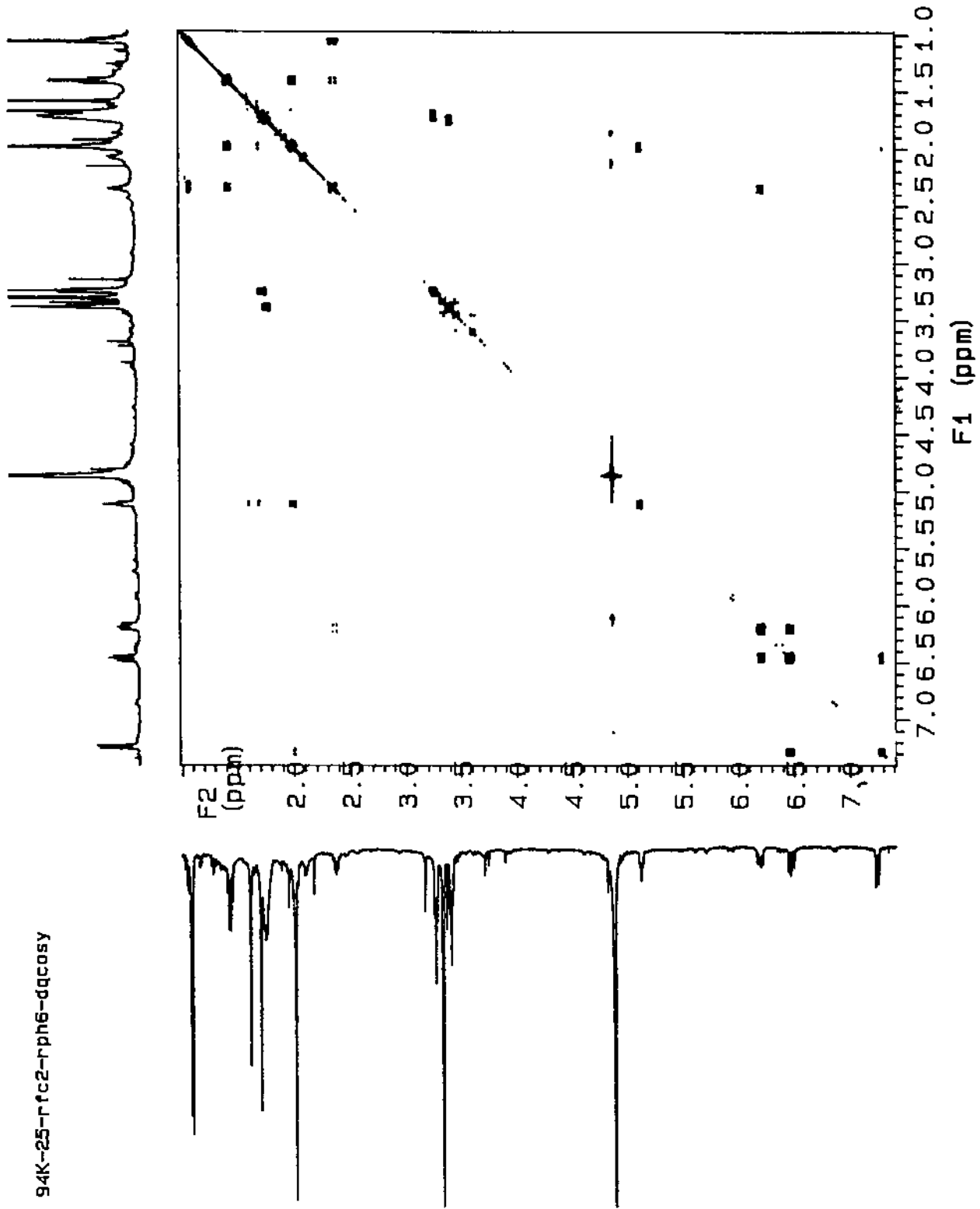


Fig. 3-112. Proton COSY spectrum of stellettadine A(96J-45-A).

94K-25-rfc2-rph6-hmqc

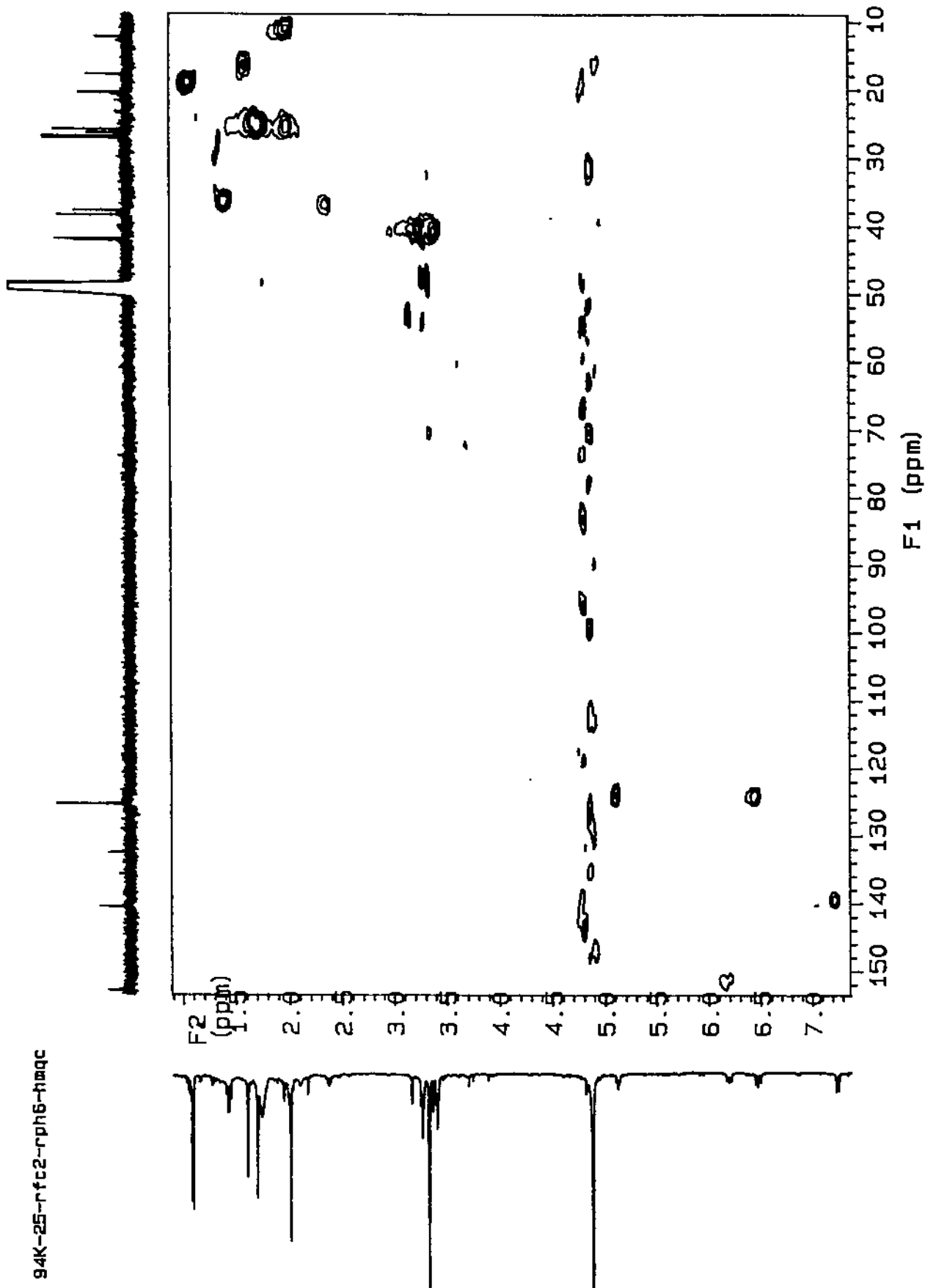


Fig. 3-113. HMQC spectrum of stelletadine A(96J-45-A).

94K-25-rfc2-rph6-hmbe-1
J=7 Hz

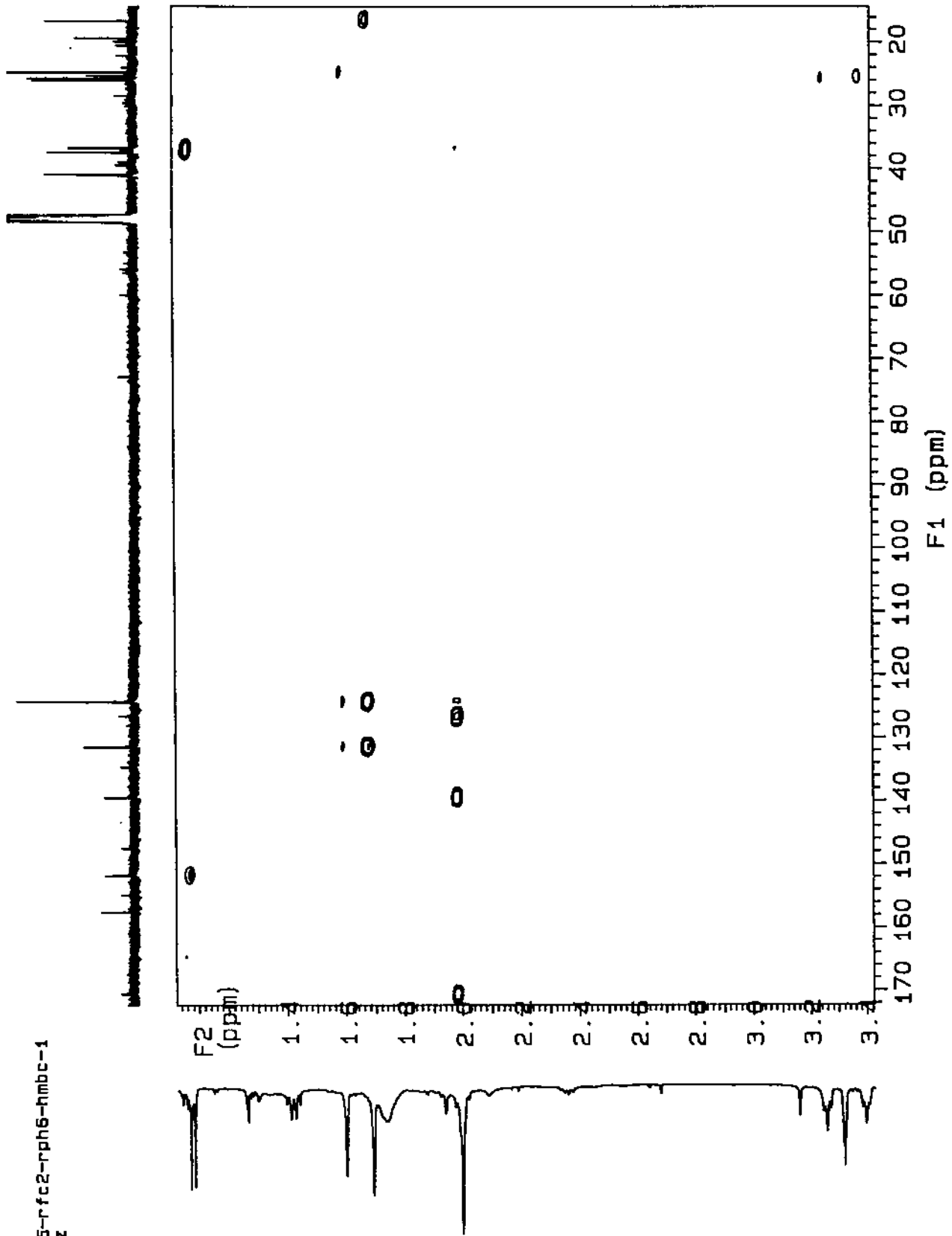


Fig. 3-114. HMBC spectrum of stelletadine A(96J-45-A).

File:7109612 Ident:7_16 Mer Def 0.25 Acq:10-JUL-1996 11:50:44 +1:57 Cal:7109601_1
ZAB-SE4F FAB+ Magnet BpM:373 BpI:9259000 TIC:53305756 Flags:HALL
File Text:Shin (Kordi) 94K-25-A MEOH/NBA

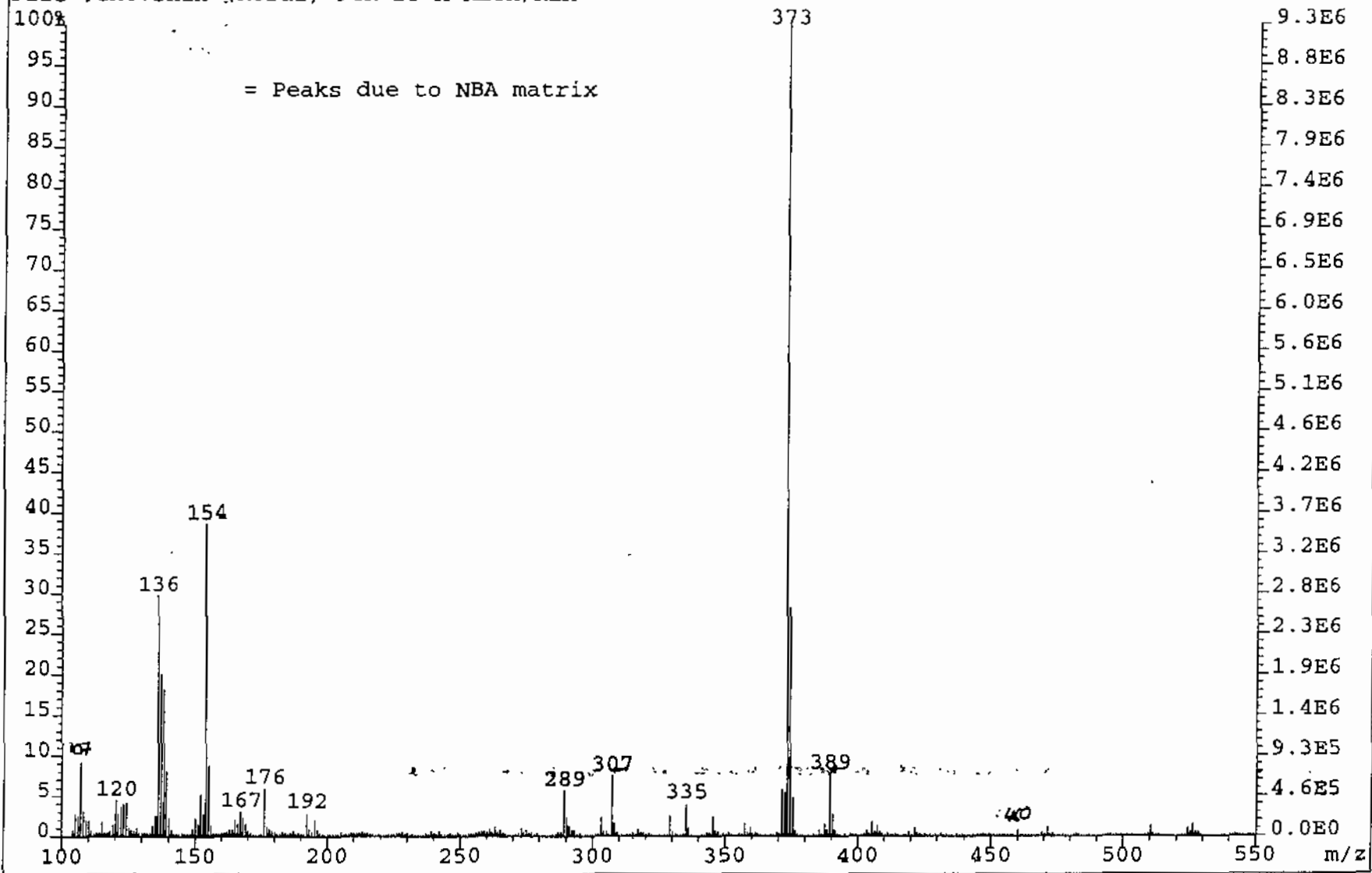


Fig. 3-115. HRMS spectrum of stelletamide B (96J-45-B).

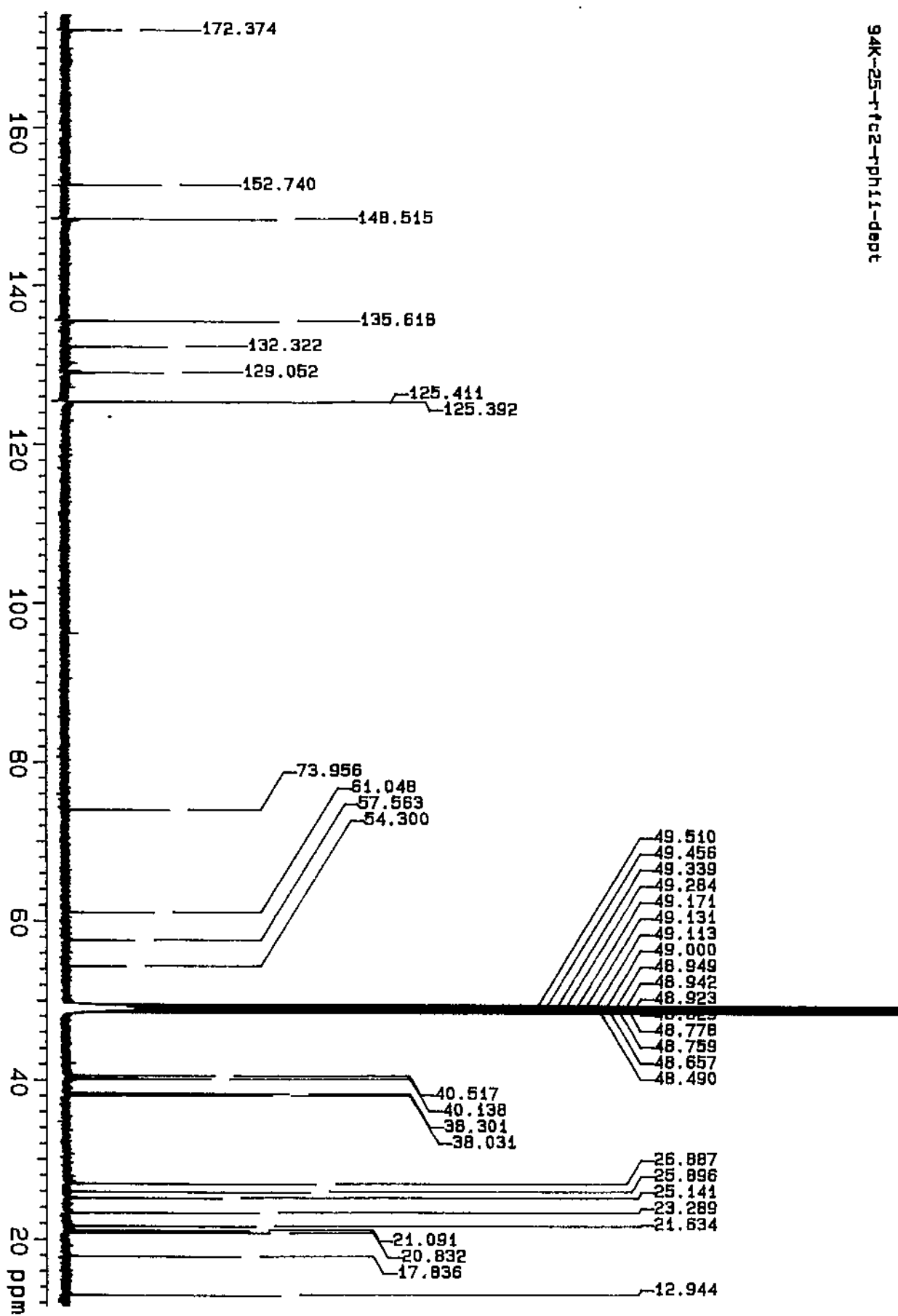


Fig. 3-116. Carbon NMR spectrum of stelletamide B(96J-45-B).

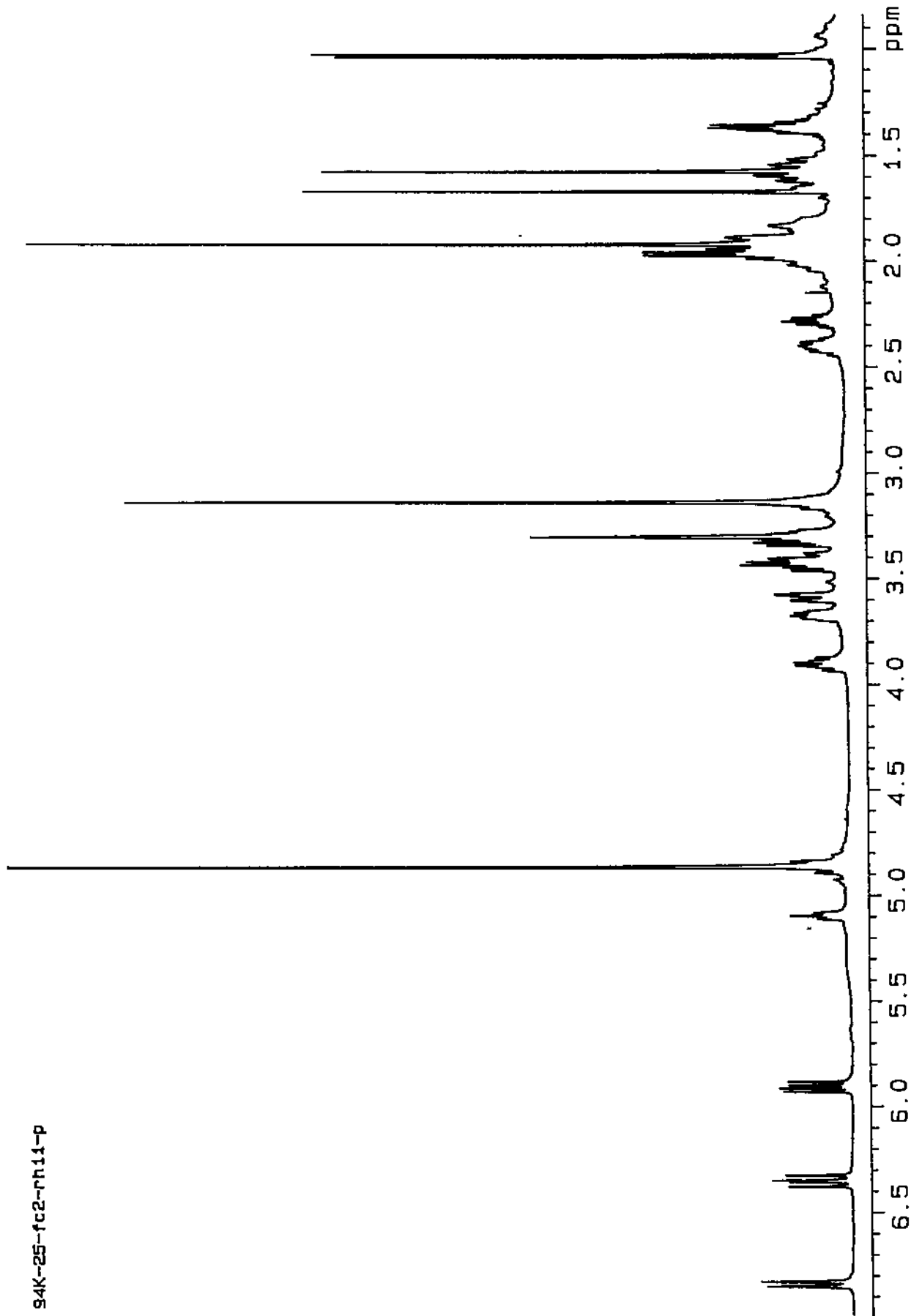


Fig. 3-117. Proton NMR spectrum of stellettamide B(96J-45-B).

94K-25-A-1-COSY45

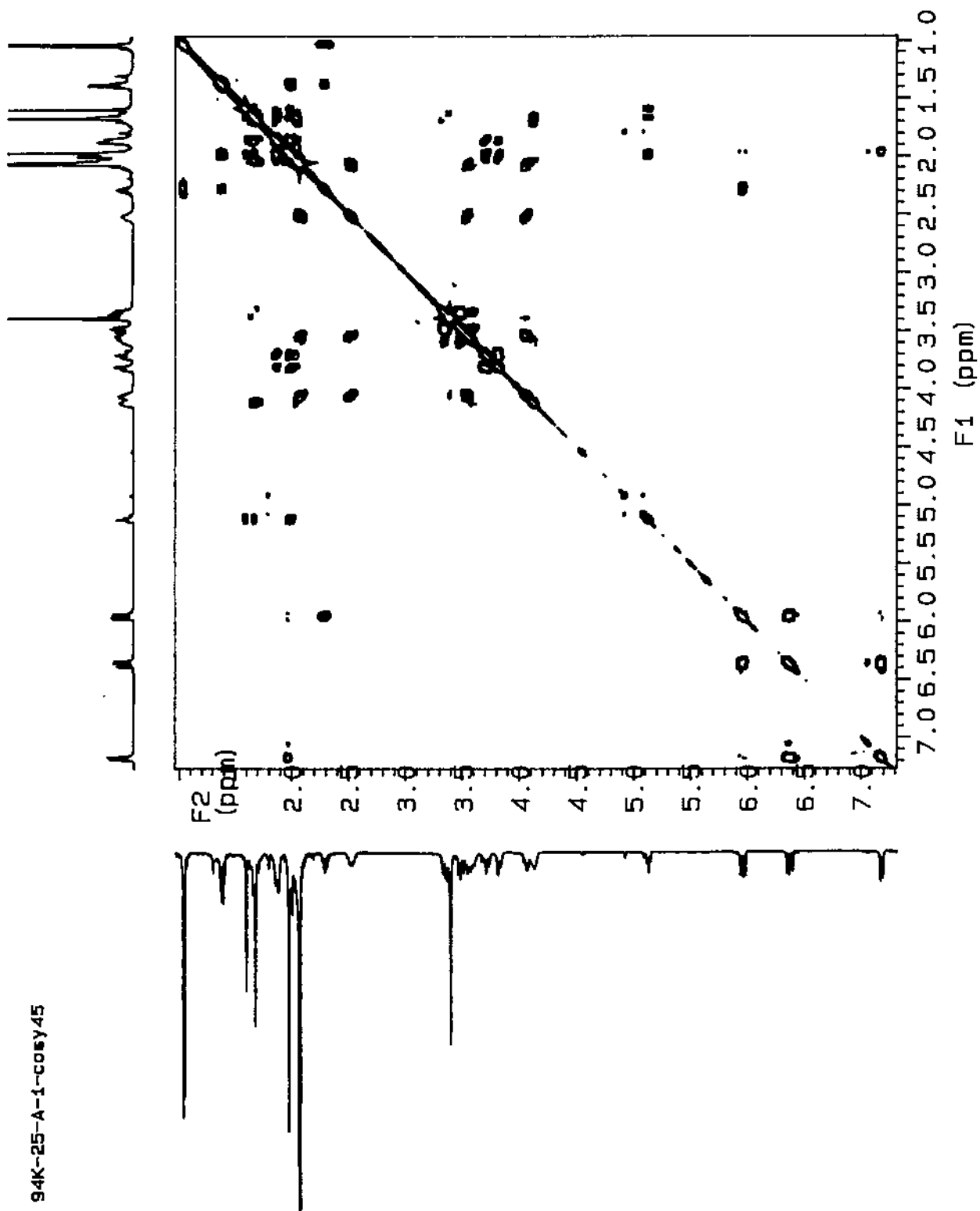


Fig. 3-118. Proton COSY spectrum of stelletamide B(96J-45-B).

94K-25-A-1-hmqc

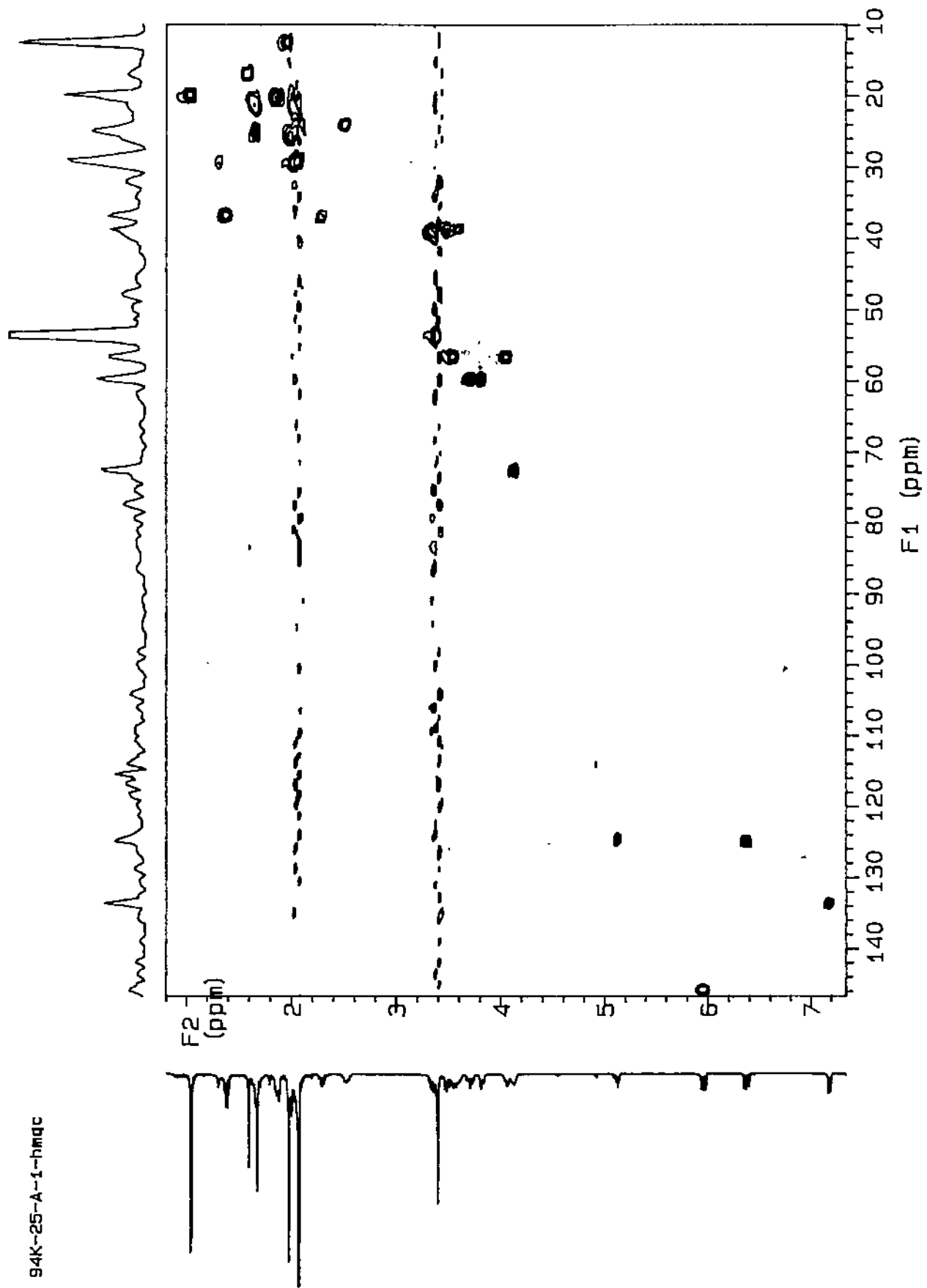


Fig. 3-119. HMQC spectrum of stelletamide B(96J-45-B).

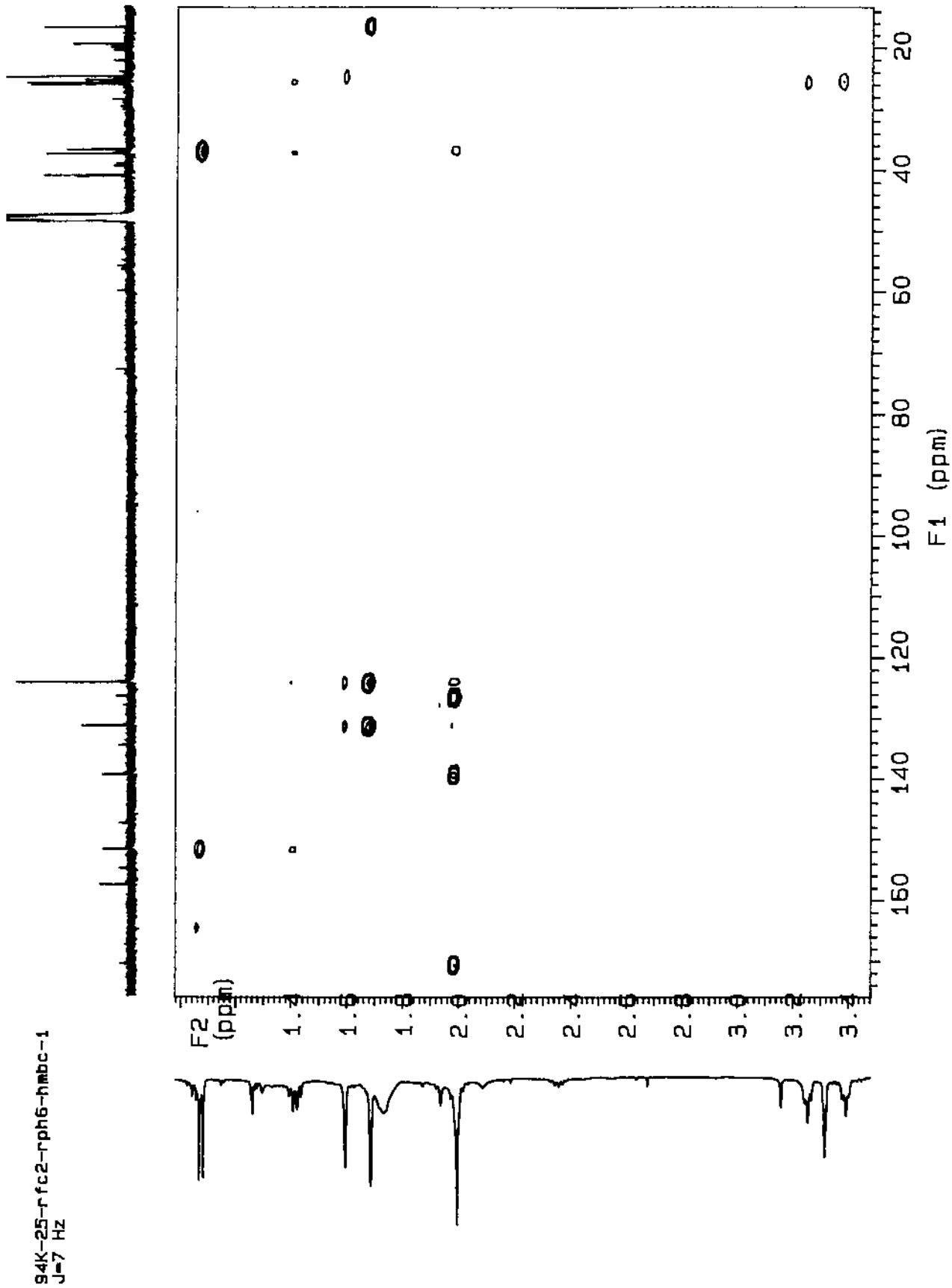


Fig. 3-120. HMBC spectrum of stelletamide B(96J-45-B).

제 6 절 해면 *Dysidea* sp.의 대사물질

1. 서론

해면 *Dysidea* sp. (시료번호 VJP-6)은 Guam 대학교 Marine Laboratory의 해양생물학 연구진과 본 연구진에 의하여 1996년 7월 Guam 섬 연안에서 SCUBA로 채집되었다. 이 시료의 형태학적인 일반적 특징은 type species *D. fragilis*와 매우 유사하였다. 그러나 시료의 자세한 동정을 위하여 해면분류의 세계적 권위자인 New Zealand의 Prof. P. R. Bergquist에게 의뢰한 바 fiber의 형태나 분포 등에서 *D. fragilis*와는 상이점(3. 실험방법 참조)이 많아 최종적으로 *Dysidea* 속에 속하는 미분류종으로 결정되었다.

문헌 조사에 의하면 *Dysidea* 속의 해면은 해면동물의 천연물 연구에서도 매우 독특한 부류에 속한다. 알려진 천연물의 수가 80을 상회할 뿐 아니라 천연물의 종류나 그 구조가 매우 다양하여 polyhydroxy- and other rearranged steroids, sesqui-, di-, and sester-terpenoids, terpene-quinones(-hydroquinones), polybrominated diphenyl ethers, chlorinated diketopiperazines, MAA(mycosporine-like amino acids) 등 전혀 다른 생합성적 기원을 가진 물질들이 망라되어 있다. 독특한 생활상과 오랜 진화의 결과로 해면에서 추출되는 천연물이 해양생물 중에서 가장 다양한 것은 주지의 사실이나 이렇듯 하나의 속의 생물로부터 여러 종류의 천연물이 발견된 것은 유례가 없는 일이다(Faulkner, 1996; 1997). *Dysidea* 속의 천연물이 이렇듯 다양한 원인은 현재까지 규명되지 않았으나 아마도 유사한 예인 해면 *Theonella swinhoei*의 경우처럼 체내에 공생하는 여러 종류의 미생물에 의하여 합성되었을 가능성이 높다(Unson & Faulkner, 1993; Bewley, et al, 1996).

Guam 대학교의 해양생물 연구진과의 공동연구에서 본 시료 VJP-6를 연구대상으로 선정한 경위는 다음과 같다: 이 *Dysidea*속의 해면은 포식자와 피식자 및 저서생물상호간의 생존경쟁이 격심한 산호초 주변의 환경에서 번성하고 있으며 흔히 다른 저서생물을 덮은 채 자라고 있었다(overgrow). 특히 이들은 해면 *Cacospongia* 속을 덮고 있는 경우가 많았는데 이 경우 *Cacospongia*에는 조직의 괴사와 기저부의 파손이 관찰되었다. 생물로부터의 추출물을 이용한 현장실험에서도 *Dysidea*의 조추출물은 *Cacospongia*에 대하여 동일한 현상을 일으켰으며 포식자에 대한 방어실험에서도 해면을 주로 섭취하는 어류 *Pomacanthus imperator*에 대한 강력한 포식억제효과를 나타내었다. 생태학적으로 특이한 현상을 나타내는 생물에 이차대사물질이 함유되어 있을 가능성이 크다는 것은 해양천연물 연구에 있어서 주지의 사실이며 *Dysidea* 속이 보여준 복합적인 생태적 특이현상은 이 생물에 강력한 생리활성 물질이 함유되어 있을 가능성이 매우 큰 것으로 해석되었다(Paul, 1988; Thacker, et al, 1997). 또한 본 연

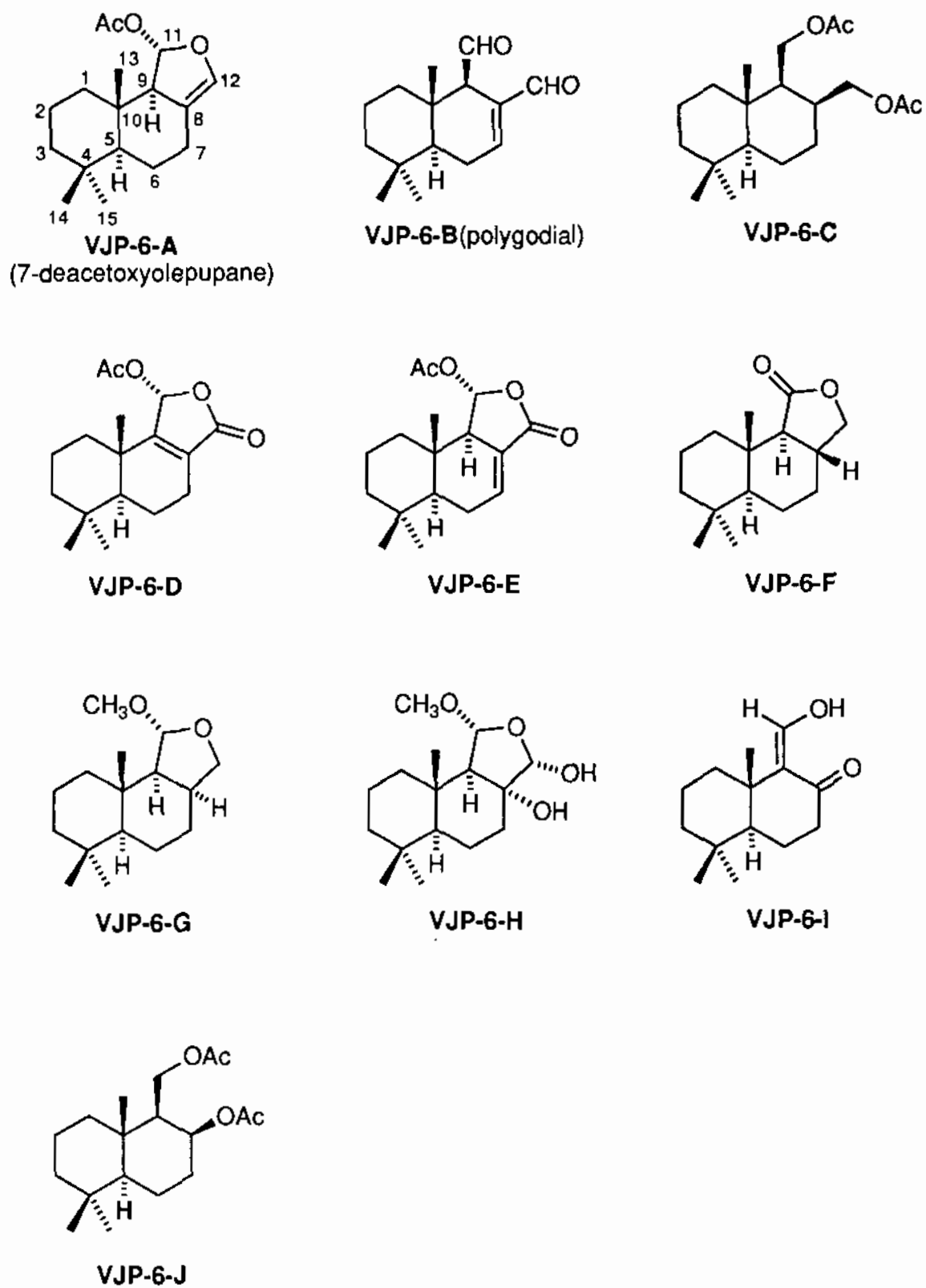


Fig. 3-121. Structures of the sesquiterpenoids of the drimane class from the sponge *Dysidea* sp.

구진에서 시료 VJP-6의 조추출물에 대한 생리활성을 조사한 결과에도 여러 종류의 해양박테리아에 대한 강한 저해활성을 나타내었다. 이리하여 동 시료를 열대 해역의 해변 중에서 일차적인 연구대상으로 선정하게 된 것이다.

유기용매를 이용한 물질의 추출, chromatography를 이용한 분리정제 및 분광학적 자료의 해석 등에 의한 본 연구의 결과를 요약하면 7 종의 신물질을 포함하는 모두 10 종의 drimane계 sesquiterpenoids를 분리, 평면 및 입체구조를 규명하였다(Fig. 3-121). 특히 이들 중 2 종의 물질은 현재까지 천연에서 발견된 바가 없는 12-nordrimane의 새로운 골격으로 이루어져 있음을 확인하였다. 생리활성 검색 결과 이들은 항박테리아와 효소활성저해 효과를 나타내었으며 화학생태학적 활성 또한 갖고 있음을 발견하였다. 이 연구결과는 최근 국제학술지인 *J. Nat. Prod.*에 full paper로 게재되었다(Paul, et al, 1997).

2. Sesquiterpenoids의 분리, 구조결정 및 생리활성

채집된 시료는 동결 건조와 waring blender를 이용한 분쇄과정을 거친 후에 CH_2Cl_2 와 MeOH로 반복하여 추출하였다. 각각의 추출액을 합한 후 감압 증류하여 용매를 제거한 조추출물에 대해서 silica vacuum flash chromatography를 하였다. 이러한 방법으로 얻어진 각각의 분획에 대하여 ^1H NMR과 TLC 분석을 하여 이차대사물질의 존재를 확인하였다. 그 결과 비극성에서 중정도 극성에 이르는 여러 분획(10-35% EtOAc/hexane)에 이차대사물질이 넓게 분포하는 것이 발견되었다. 따라서 이들은 극성이 비슷한 세 가지 그룹(10-15%; 20-25%; 30-35% EtOAc/hexane)으로 나누어 천연물의 분리를 시도하였다. 천연물의 분리 방법은 먼저 silica semi-preparative HPLC를 하여 각각의 물질을 극성에 따라 분리한 후에 순도가 낮은 경우에는 C_{18} reversed-phase HPLC으로 최종적인 정제과정을 거쳤다. 이러한 방법으로 모두 10 종의 천연물(VJP-6-A~J)이 얻어졌으며 분리한 물질의 양은 주 대사물질인 VJP-6-A는 465 mg(해면 건조중량의 1.9%)에 달하였으나 나머지 대부분의 물질은 10-25 mg(0.04-0.1%)이었으며 미소 대사물질인 VJP-6-G는 2.2 mg(0.0088%)에 불과하였다.

주 대사물질인 VJP-6-A가 백색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 HREIMS와 ^{13}C NMR spectrum에 의하여 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 3-122). 이 물질의 NMR 자료에서는 하나의 acetoxy기 [^1H δ 2.04(3H, s); ^{13}C δ 169.4(C), 20.8(CH_3)]의 존재가 명확히 드러났다. ^1H NMR spectrum에서 δ 6.02(1H, dd, $J = 2.0, 2.0$ Hz)에 나타난 signal의 위치와 splitting pattern은 하나의 독립된 이중결합의 존재를 의미하는 것으로 이에 상응하는 peaks가 ^{13}C NMR data에서 δ 134.2(CH)와 114.3(C)에 나타났다(Fig. 3-123 and 3-124). 이 물질의 분자식에서 두 개의 이중결합을 제외한 결과 물질 VJP-6-A는 삼중고리 화합물임이 분명하였다.

이 물질의 대체적인 구조는 ^1H COSY, HMQC 및 HMBC 실험에 의하여 결정되었다. 특히 ^1H NMR spectrum의 upfield region에 나타난 세 개의 methyl peaks들과의 HMBC 상관관계에 의하여 ring A와 B의 대체적인 구조가 결정되었다. ^{13}C 와 ^1H NMR data에서 각각 δ 98.1(CH) 및 6.27(1H, d, $J = 2.4$ Hz)에 나타난 작용기는 하나의 acetal(혹은 hemiacetal)기로 해석되었다. 이 methine proton과 전기한 acetoxy carbon과의 3-bond H-C coupling으로서 acetoxy acetal 작용기의 위치가 결정되었다. 마지막으로 이중결합과 acetal기와의 결합은 2D NMR 실험에서 직접 규명되지는 못하였으나 해당하는 탄소 및 수소원자들의 NMR 상에서의 위치와 물질의 분자식을 고려할 때 이들 두 개의 작용기는 하나의 산소원자에 의하여 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 이리하여 천연물 VJP-6-A의 구조는 1-acetoxy-1,2-dihydrofuran기를 가진 [6,6]-drimane계 물질로 결정되었다. 문헌조사 결과 이 물질은 호주 연안의 해변 *Dysidea* 속과 연체동물 *Dendrodoris* spp.로부터 분리된 7-deacetoxyolepupane으로 밝혀졌다(Avila, et al, 1991; Garson, et al, 1992; Butler & Capon, 1993). VJP-6-A의 optical rotation ($[\alpha]_D^{25} -153.9^\circ$)도 보고된 값($[\alpha]_D^{25} -166.7^\circ$)과 매우 유사하여 두 물질의 입체배열도 동일함을 알 수 있었다.

유사한 물질인 VJP-6-B가 백색의 고체로 분리되었으며 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 로 분자식이 결정되었다(Fig. 3-125). 이 물질의 ^1H NMR data에서 두드러진 특징은 대단히 downfield에 두 개의 signals가 나타난 점이었다: δ 9.50(1H, d, $J = 4.3$ Hz), 9.43(1H, s). 상응하는 carbon signals가 δ 201.9(CH)와 193.2(CH)에 나타났으므로 이들의 chemical shifts로 미루어 각각 하나의 aldehyde와 α, β -unsaturated aldehyde로 해석되었다(Fig. 3-126 and 3-127). 이 해석을 지지하는 주요한 증거는 IR spectrum상에서 1720과 1680 cm^{-1} 에 나타난 두 개의 강한 흡광밴드이었다.

물질 VJP-6-B의 구조 역시 2D NMR 자료의 해석에 의하여 결정되었다. 특히 두 개의 aldehyde protons와 δ 138.2(C, C-8) 및 60.3(CH, C-9)에 위치한 탄소들 간의 강한 HMBC correlations는 aldehyde 기의 위치를 각각 C-11과 C-12에 지정시켰다. 물질 VJP-6-A의 경우와 마찬가지로 나머지 부분의 구조는 ^1H COSY 자료 및 세 개의 upfield proton signals과 인접한 탄소들과의 H-C correlations로 결정되었다. 이리하여 천연물 VJP-6-B의 구조는 두 개의 aldehyde 기를 가진 drimane계 sesquiterpenoid로 결정되었다.

문헌조사 결과 이 물질은 육상식물과 연체동물의 천연물로 널리 알려진 polygodial임이 밝혀졌으며 optical rotational value ($[\alpha]_D^{25} -123.4^\circ$)도 문헌에서 보고된 값 ($[\alpha]_D^{25} -131^\circ$)과 거의 일치하였다(Mori & Watanabe, 1986; Jansen & de Groot, 1991)(Fig. 3-121). Polygodial은 무엇보다도 특유의 매운 맛으로 너무나 유명한 천연물로서 이 물질의 매운 맛은 C-11과 C-12에 위치한 두 개의 aldehyde기가 미각세포의 끝에 위치한 하나의 amino기와 화학반응을 일으켜 pyrrole기를 형성하기 때문으로 알려져 있다. 따라서 C-9 위치의 입체구조가 반대로 될 경우에는 두 aldehydes 사이의 거리

가 떨어져 pyrrole을 형성할 수 없으므로 매운 맛이 사라진다는 사실도 보고되어 있다 (Cimino et al, 1985). 전기한 바와 같이 polygodial(VJP-6-B)는 해양생물 중에서는 nudibranch 강의 연체동물에서만 발견되어 왔으며 해면동물에서 발견된 것은 본 연구가 최초의 결과이다. 해양생태계에서의 먹이사슬 상의 위치를 고려할 때 이 천연물 역시 *Dysidea* 속 해면의 고유한 대사물질이 포식자인 연체동물의 체내에 축적되어 있었던 것으로 생각된다(Paul, personal commun.).

유사한 천연물인 물질 VJP-6-C가 무색의 액체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 HRCIMS와 ^{13}C NMR 자료의 해석에 의하여 $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 로 결정되었다(Fig. 3-128). NMR 상에서 19 개의 탄소 signals가 발견되었으나 두 개의 acetoxy기의 존재가 ^1H 와 ^{13}C NMR 상에서 쉽게 지정되었으므로 이 물질 역시 이중고리 sesquiterpenoid임이 명확하였다: ^1H δ 2.02(6H, s); ^{13}C δ 171.2(C x 2), 21.1(CH_3 x 2)(Fig. 3-129 and 3-130). 이 천연물의 구조 역시 NMR 자료의 종합적인 해석에 의하여 drimane계 물질로 밝혀졌으며 두 개의 acetoxy기의 위치는 각각 C-11 및 C-12로 지정되었는데 그 근거는 HMBC 실험에서 δ 4.26(1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-11)과 4.12(1H, dd, $J = 10.7, 10.3$ Hz, H-12)에 위치한 수소와 carbonyl carbons와의 3-bond H-C correlations이었다. 전기한 7-deacetoxyoleupane 및 polygodial과 마찬가지로 물질 VJP-6-C 역시 알려진 물질임이 문헌조사에 의하여 밝혀졌다(Fig. 3-121). 이 천연물은 아주 최근에 New Caledonia에서 채집된 해면 *D. fusca*의 부대사물질로 보고되었다(Montagnac, et al, 1996). NMR 자료가 유사하였을 뿐 아니라 optical rotational value($[\alpha]_D^{25} -37.2^\circ$)도 보고된 값($[\alpha]_D^{25} +37^\circ$)과 거의 일치하였으므로 두 물질은 완전히 동일한 것으로 생각된다.

무색의 액체상태로 분리된 신물질 VJP-6-D의 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$ 로 결정되었다(Fig. 3-131). 이 물질의 NMR 자료는 상기의 VJP-6-A~C와 유사점이 많았으나 특이한 점이 다수 발견되었다. 먼저 ^{13}C NMR spectrum에서 170.9(C), 165.6(C), 128.4(C)에 나타나는 세 개의 quaternary carbon signals는 하나의 α, β -unsaturated lactone의 존재를 강력히 시사하는 것으로 해석되었다(Fig. 3-132). 이를 지지하는 증거로는 IR spectrum 상에서 ν_{max} 1780과 1760 cm^{-1} 에 나타나는 강한 흡광밴드와 UV spectrum에서 λ_{max} 221(log ϵ 3.65) nm에 나타나는 peak이었다. 한편 ^{13}C NMR data에서 δ 90.7(CH)에 위치한 탄소 및 이에 상응하여 ^1H NMR에서 δ 6.95(1H, dd, $J = 1.9, 1.5$ Hz)에 나타나는 수소는 VJP-6-A와의 자료 비교에 의하여 하나의 acetal기의 존재를 의미하는 것으로 해석되었다(Fig. 3-133).

이상의 정보를 바탕으로 하여 물질 VJP-6-D의 구조는 ^1H COSY, HMQC, HMBC 및 NOESY 실험의 결과를 종합하여 규명되었다. 특히 HMBC 자료에서 H-5, H-6, H-13, H-14 및 H-15에 해당하는 수소 signals와 이들에 이웃하는 탄소 signals들과의 무수한 2-, 3-bond correlations는 이 물질의 6-membered A와 B rings의 구조를 결정하는데 있어서 가장 중요한 자료이었다. 전기한 lactone ring 및 그에 접합된 acetoxy기의 존재는 ^1H NMR spectrum에서 δ 6.95에 나타나는 수소와 lactone 및 acetoxy-carbonyl carbons과의

H-C correlations로 명확히 증명되었다. 그러나 이 자료만으로는 물질 VJP-6-D의 구조를 규명하는데 부족하였다. 왜냐하면 acetoxy기를 가진 lactone ring의 평면배열은 두 가지 형태가 가능하였기 때문이다. 즉 2D NMR 자료상 전기한 lactone carbonyl과 acetal carbons은 C-11과 C-12 중 어느 위치에도 배열이 가능하였다.

이 문제의 해결은 2D NMR 실험의 종합적인 해석에 의하여 지정된 C-8과 C-9 탄소의 chemical shifts로부터 해결이 가능하였다. 즉 ^1H COSY와 HMQC 실험으로 지정된 H-6eq, H-7ax, H-7eq, H-11 등과의 공통된 상관관계에 의하여 $\delta 128.4$ 에 위치한 quaternary carbon이 C-8로 지정되었으며 마찬가지로 H-5, H-7ax, H-7eq, H-13 등과의 상관관계에 의하여 $\delta 165.6$ 의 quaternary carbon이 C-9으로 지정되었다. 일반적으로 α, β -unsaturated carbonyl기의 ^{13}C NMR data에 있어서 산소나 질소 등 전기음성도가 매우 큰 원소가 α 위치에 접합되지 않는 경우에는 α 탄소의 chemical shift가 β 탄소보다 훨씬 downfield shift된다는 것은 주지의 사실이다(Wehrli & Wirthlin, 1978; Kalinowski, et al, 1988). 따라서 $\delta 128.4$ 와 165.6 의 탄소가 각각 α 와 β 위치를 점하기 위해서는 lactone carbonyl은 C-12에 위치하고 acetal carbon은 C-11에 해당한다. 이리하여 신물질 VJP-6-D의 구조는 unsaturated γ -lactone기를 가진 drimane계 sesquiterpenoid로 결정되었다(Fig. 3-121).

물질 VJP-6-D에는 C-5, C-10, C-11등 세 위치에 비대칭 탄소 중심(asymmetric carbon centers)가 존재한다. 이들 중에서 A/B rings 간의 접합점의 상대배열은 $\delta 1.32$ 에 위치한 H-5(1H, dd, $J = 12.7, 2.0$ Hz)의 coupling constants와 H-5 및 H-13과 인접한 수소 signals와의 NOE correlations에 의하여 *trans*로 결정되었다. 마찬가지로 H-13과 H-11 사이의 NOE correlation에 의하여 C-11의 상대배열은 $11R$ 로 지정되었다.

유사한 물질인 VJP-6-E가 무색의 액체로 분리되었으며 HRCIMS 자료와 ^{13}C NMR 분석에 의하여 그 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$ 로 VJP-6-D와 동일한 것으로 해석되었다(Fig. 3-134). 이 물질의 다른 분광자료 역시 VJP-6-D와 여러 가지 면에서 매우 유사하였다. 그러나 ^{13}C NMR spectrum에서 두드러진 차이점은 VJP-6-D의 C-9에 해당하던 quaternary carbon의 signal($\delta 165.4$)이 upfield methine($\delta 56.1$)로 대체되었으며 C-7 methylene($\delta 21.4$) 역시 VJP-6-E에서는 olefinic methine($\delta 137.6$)으로 바뀌어 진 점이였다(Fig. 3-135). 이에 상응하는 차이점이 ^1H NMR spectrum에서도 발견되어 전자에서는 보이지 않았던 새로운 olefinic proton이 $\delta 6.90$ (1H, ddd, $J = 3.4, 3.4, 3.4$ Hz)에 나타났다(Fig. 3-136).

NMR 자료상에서 보여준 이러한 모든 차이점은 VJP-6-D의 C-8(9) 이중결합이 VJP-6-E에서는 C-7(8)로 이동함으로써 수용이 가능하였다. 이 해석은 2D NMR 자료의 종합적인 해석으로 가능하였으며 특히 HMBC 실험에서 H-9 signal($\delta 2.68$, 1H, m)과 C-7($\delta 137.6$, CH) 및 C-13($\delta 14.2$, CH_3)과의 long-range H-C correlations로 완벽히 입증되었다. 이 물질에서의 비대칭 탄소 중심의 상대배열은 NOESY 자료에서 나타난 H-5와 H-9 사이 및 H-11과 H-13 사이의 상관관계에 의하여 $9R, 11R$ 로 지정되었다. 이리하여 신물

질 **VJP-6-E**의 구조는 drimane계 sesquiterpenoidal lactone으로 결정되었다(Fig. 3-121).

백색의 고체로 얻어진 물질 **VJP-6-F**의 분자식은 HREIMS와 carbon NMR 분석에 의하여 $C_{15}H_{24}O_2$ 로 해석되었다(Fig. 3-137). 다른 천연물과 마찬가지로 이 물질의 NMR 자료는 drimane계 sesquiterpenoids의 특징적인 [6,6]-bicyclic system이 존재함을 보여 주었다(Fig. 3-138 and 3-139). ^{13}C NMR spectrum 상에서 $\delta 175.8(C)$ 에 나타난 signal과 IR 자료에서 1765 cm^{-1} 에 나타난 강한 흡광 band는 하나의 saturated lactone의 존재를 드러내었다. 이 물질에 존재하는 모든 수소와 탄소의 NMR 상에서의 위치는 2D NMR 실험의 조합에 의하여 결정되었다. 특히 lactone carbonyl의 위치는 이 탄소와 $\delta 1.69(1H, d, J = 13.7\text{ Hz}, H-9)$ 에 위치한 하나의 methine proton 및 $\delta 4.23(1H, dd, J = 8.3, 6.4\text{ Hz}, H-12)$ 과 $3.66(1H, dd, J = 11.2, 8.3\text{ Hz}, H-12)$ 에 위치한 methylene protons 등과의 H-C correlations에 의하여 C-11으로 지정되었다. 이 천연물에는 B-ring에 C-5, C-8, C-9, C-10 등 4개의 비대칭 탄소 중심이 존재하였는데 이들 중에서 먼저 C-5와 C-10 등 A/B ring junction의 입체구조는 $\delta 0.90$ 에 나타난 H-5의 coupling constants($dd, J = 13.2, 2.9\text{ Hz}$)와 H-13 methyl protons의 NOE pattern으로부터 *trans*로 쉽게 결정되었다. 한편 서로 인접한 C-8과 C-9의 상대적 입체배열은 이들 사이의 큰 coupling constant($J_{8,9} = 13.7\text{ Hz}$)와 H-8 methine proton과 H-13 methyl protons간의 전형적인 1,3-diaxial orientation에 기인한 것으로 추측되는 강한 NOE 상관관계로부터 $8R^*, 9R^*$ 로 결정되었다. 이리하여 신물질 **VJP-6-F**의 구조는 lactonized C ring을 가진 삼중고리 sesquiterpenoid로 결정되었다(Fig. 3-121).

천연물 **VJP-6-G**의 분자식은 HREIMS 자료로부터 $C_{15}H_{26}O$ 로 얻어 졌다(Fig. 3-140). 그러나 ^{13}C NMR spectrum에서 16 개의 peaks가 나타났으며 DEPT 실험에서 모두 28개의 수소가 탄소에 접합되어 있음을 발견하였다. 따라서 EIMS에서 나타난 m/z peak는 $[M \cdot OCH_3]^+$ 에 해당하는 것이며 이 물질의 실제적인 분자식은 $C_{16}H_{28}O_2$ 로 결론이 지워졌다. 물질 **VJP-6-G**의 NMR 자료는 **VJP-6-F**와 여러 가지 면에서 매우 유사하였다. 그러나 ^{13}C NMR spectrum상에서 가장 큰 차이점은 **VJP-6-F**의 $\delta 175.8$ 에 나타났던 carbonyl carbon(C-11)이 $\delta 107.2(C)$ 의 acetal carbon과 $\delta 54.3(CH_3)$ 의 methoxy carbon으로 바뀐 점이였다(Fig. 3-141). 이에 상응하는 변화가 1H NMR spectrum에서도 관찰되어 새로운 acetal과 methoxy protons의 signals이 $\delta 4.72(1H, br s)$ 와 $3.28(3H, s)$ 에 나타났다(Fig. 3-142). 또한 **VJP-6-F**의 IR spectrum에서 1765 cm^{-1} 에 나타났던 ester의 강한 stretching band가 사라진 것도 lactone이 acetal(혹은 hemiacetal)로 변한 것을 지지하였다. 이 물질의 구조 역시 1H COSY, HMQC, HMBC 등 2D NMR 실험에 의하여 대부분 밝혀졌는데 핵심부분인 acetal의 위치는 이 proton($\delta 4.72$)과 C-8($\delta 34.1, CH$)및 C-9($\delta 58.8, CH$) 등과의 H-C 상관관계에 의하여 C-11으로 결정되었으며 methoxy기의 위치 또한 methoxy proton(carbon)과 acetal carbon(proton)과의 상관관계에 의하여 C-11에 접합된 것으로 판명되었다. 마지막으로 C-11과 C-12 사이에 존재하는 ether linkage는

C-11과 H-12 (δ 3.96, 3.56) 및 H-11과 C-12 (δ 72.2) 사이에 나타난 여러 개의 HMBC 상관관계로 규명되었다. 이리하여 신물질 VJP-6-G의 평면구조는 VJP-6-F의 γ -lactone 이 methoxy acetal로 변화한 유도체로 결정되었다.

물질 VJP-6-G에는 C-5와 C-10 등 전형적인 *trans* A/B ring junction 이외에도 C ring에 C-8, C-9, C-11 등 서로 이웃하는 세 개의 비대칭 탄소 중심이 존재한다. 그러나 proton coupling constants ($J_{8,9}$ vs: $J_{8,11} \sim 7.5$ Hz)의 측정값은 이들의 입체배열을 규명하는데 아무런 도움이 되지 못하였다. 따라서 이들의 상대적 입체배열은 NOESY 실험과 3차원 모델연구에 의하여 규명되었다. H-12 methylene protons 중의 하나 (δ 3.56)와 H-13 methyl protons (δ 0.90) 간에 나타난 강한 NOE 상관관계는 C-12와 C-13이 공간적으로 가까이 위치함을 드러내었다. 또한 H-5 methine proton (δ 0.80)과 H-9 methine (δ 1.64) 사이에도 NOE correlation이 발견되었다. 실제적인 3차원 모델을 만들어 본 결과, 이러한 공간적인 근접함을 나타내기 위해서는 B/C ring junction은 *cis* 형태로 배치되어 있어야 함을 알 수 있었다: H-8 α , H-9 α . 마찬가지로 H-11의 β -orientation (C ring에 대하여)도 이 수소와 H-13 사이의 NOE correlation에 의하여 규명되었다. 따라서 VJP-6-G의 C ring에 존재하는 비대칭 탄소의 상대적 입체배열은 $8R^*$, $9S^*$, $11R^*$ 로 결정되었으며 이 결과는 유사한 물질인 VJP-6-F와는 C-9의 입체배열이 반대임을 의미하였다 (Fig. 3-121). 물질 VJP-6-G의 입체구조 결정의 정확함을 확인하기 위하여 문헌을 조사해 본 결과 이 천연물과 유사한 hemiacetal (VJP-6-G는 acetal기를 보유)기를 갖고 있는 하나의 sesquiterpenoid가 수년 전 호주 연안에 서식하는 *Dysidea* 속에서 분리되었으며 최근에도 동일한 물질이 남서 태평양에서 채집된 *D. fusca*로부터 발견된 바가 있음을 확인하였다 (Butler & Capon, 1993; Montagnac, et al, 1996). 그러나 당초 $11S^*$ 로 제시되었던 입체 구조는 정밀한 NOE 분석에 의하여 $11R^*$ 로 수정되었음을 확인하였다. 본 연구에서 제시한 $11R^*$ configuration의 타당성을 확인하기 위하여 hemiacetal에 대하여 보고된 NMR 자료와 VJP-6-G를 비교해 본 결과 C-11 및 그 주변에 위치한 수소 및 탄소의 chemical shifts가 거의 일치하였으므로 이러한 해석에 대한 신뢰성을 더하게 되었다 (Montagnac, et al, 1996).

비교적 극성이 높은 점성의 반고형 형태로 분리된 신물질 VJP-6-H에 대하여 ammonia를 carrier gas로 이용한 HRCIMS 분석을 수행한 결과 하나의 의사분자이온 (quasi-molecular ion)이 m/z 284.2225에 나타났는데 이는 $C_{16}H_{30}NO_3$ 즉 $[M+NH_4]^+$ 에 해당하였으므로 천연물의 분자식은 $C_{16}H_{28}O_3$ 로 분석되었다 (Fig. 3-143). 그러나 이 물질의 ^{13}C NMR spectrum에서는 δ 105.4 (CH), 102.2 (CH), 76.9 (C), 54.3 (CH₃) 등 4개의 산소가 접합된 탄소의 존재가 드러났으며 IR spectrum에서도 3450 cm^{-1} 에 hydroxyl기 특유의 강하고 넓은 stretching band가 나타났다 (Fig. 3-144). 따라서 물질 VJP-6-H에는 -질량분석에서 제시된 것 보다 하나 더 많은 hydroxyl기가 존재하며 실제의 분자식은 $C_{16}H_{28}O_4$ 로 최종 결정되었다. 물질 VJP-6-H의 NMR spectrum은 VJP-6-G와 여러모로 유사

한 점이 많았다. 특히 후자에 존재하였던 methoxy acetal에 해당하는 탄소 및 수소가 거의 동일한 위치에서 관찰되었다; ^1H δ 4.66(1H, br s), 3.36(3H, s); ^{13}C δ 105.4 (CH), 54.3(CH₃)(Fig. 3-144 and 3-145).

여러 종류의 2D NMR 자료를 종합하여 분석한 결과 VJP-6-H는 VJP-6-G와 완전히 동일한 ring A 및 B를 보유하고 있음이 드러났다. 따라서 모든 구조적 차이점은 ring C에 집중되어 있었다. VJP-6-G의 ^{13}C NMR spectrum에서 C-8과 C-12는 각각 δ 34.1(CH)와 δ 72.2(CH₂)에 존재하였는데 이들이 δ 102.2(CH)와 76.9(C)의 위치로 downfield shifts된 것은 새로이 나타난 hydroxyl기가 이들 탄소에 접합되어 있음을 의미하였다. 그러므로 VJP-6-G의 C-8 methine과 C-12 oxymethylene이 VJP-6-H에서는 각각 quaternary carbinol과 acetal(혹은 hemiacetal)로 변환된 것으로 해석되었다. 이 해석을 지지하는 결정적인 증거는 HMBC 실험에서 H-9(δ 1.80, 1H, br s) -HMQC 및 H-13과의 long-range correlation으로 지정이 되었던- 과 이들 탄소와의 2-, 3-bond H-C 상관관계가 발견된 것이다. 따라서 물질 VJP-6-H는 두 개의 acetal과 hemiacetal기를 각각 C-11과 C-12에 보유하고 있는 것(*vice versa*)으로 생각되었다. 이 양자 간의 작용기의 구분은 이 물질에 존재하는 유일한 methoxy기의 수소(탄소)의 signals가 C-11의 탄소(수소) signals와 이종의(mutual) HMBC 상관관계를 드러냄으로서 쉽게 해결되었다. 이리하여 천연물 VJP-6-H의 구조는 VJP-6-G의 C-8과 C-12에 hydroxyl기가 접합된 유도체임이 밝혀졌다.

물질 VJP-6-H에는 drimane계 sesquiterpenoids의 전형적인 *trans* A/B ring junction(C-5, C-10)에 추가하여 C ring에 C-8, C-9, C-10, C-11등 tetrahydrofuran의 모든 위치가 비대칭 탄소 중심으로 이루어져 있다. NOESY spectrum에서 H-1eq(δ 1.71), H-11(δ 4.66), H-13(δ 0.87)등 세 개의 수소 상호간(mutual)의 공통된 상관관계가 발견이 되었다. 또한 H-12(δ 5.15)와 H-13 사이에도 강한 NOE 관계가 발견되었다. 실제적인 3차원 모델을 이용한 연구 결과 상기의 수소원자 간의 NOE가 나타나기 위해서는 B/C ring 사이의 접합점은 *cis* orientation을 이루어야 함이 드러났다. 또한 H-11과 H-12는 모두가 C ring에 대하여 β -orientation을 취해야만 하였다. 이러한 공간적 배열을 더욱 지지하는 증거로는 H-1ax 및 H-5 등 α -orientation을 이루는 것으로 이미 알려져 있는 (*trans* A/B junction) 수소원자와 H-9(δ 1.80)과의 NOE 상관관계이다. 이리하여 물질 VJP-6-H의 C ring에 위치한 비대칭 탄소중심의 상대적 배열은 $8R', 9R', 11R', 12S'$ 로 결정되었다(Fig. 3-121).

백색의 고체 형태로 분리된 신물질 VJP-6-I의 분자식은 HREIMS와 ^{13}C NMR 자료분석에 의하여 C₁₄H₂₂O₂로 해석되었다(Fig. 3-146). Carbon NMR 에서 sesquiterpenes의 탄소 중 하나의 signal이 사라진 사실(norsesquiterpene) 이외에도 이 물질의 분광자료는 다른 천연물과의 상이점이 다수 발견되었다. 먼저 ^{13}C NMR 자료에서는 세 개의 downfield carbons가 δ 188.9(C), 183.0(CH) 및 122.8(C)에 나타났다(Fig. 3-147). 당초에는 전자 두 개의 탄소 signals는 그 chemical shifts로 보아 각각 unsaturated ketone과

aldehyde로 생각되었으나 위에서 언급한 바와 같이 olefinic region에 단지 하나의 탄소 signal만 발견되었기 때문에 위의 세 탄소가 모두 합해져서 하나의 enolized β -dicarbonyl 기를 구성하는 것으로 수정되었다. 이러한 특이한 작용기의 존재를 지지하는 중요한 증거로는 IR spectrum에서 3500(broad, -OH stretching)과 1620(C=O stretching of β -hydroxy- α, β -unsaturated ketone) cm^{-1} 에 강한 흡광밴드가 나타난 점과 UV spectrum에서 294 ($\log \epsilon$ 3.34) nm에 큰 흡광 maximum이 나타난 점 등이었다 (Nakanishi & Solomon, 1977). 또한 ^1H NMR spectrum에서 δ 15.36(1H, d, $J = 4.4$ Hz)과 8.60(1H, d, $J = 4.4$ Hz)에 서로 coupling을 하는 두 개의 signals가 발견되었으며 특히 전자가 D_2O 와 교환현상을 나타내는 사실이 enolized된 작용기의 존재를 강력히 시사하였다(Fig. 3-148). 따라서 물질 VJP-6-I는 하나의 enolized β -dicarbonyl 형태의 작용기를 갖고 있으며 이러한 특이한 작용기는 carbonyl 기의 산소 원자와 enolic hydroxyl기 사이의 수소 결합에 의하여 유지가 되고 있는 것으로 생각되었다.

이상의 여러 가지 정보를 바탕으로 하여 VJP-6-A~H 등과는 상이하게 norsesquiterpene계에 속하는 물질 VJP-6-I의 구조는 ^1H COSY, HMQC 및 HMBC 실험으로 규명되었다. 먼저 HMQC 실험에 의하여 이 물질에 존재하는 모든 수소와 그들이 결합된 탄소의 지정이 이루어졌으며 수소원자 사이의 상관관계도 ^1H COSY 실험으로 대부분 이루어졌다. 이 둘 두 가지 정보의 검증 및 결합은 HMBC 실험에 의하여 가능하였는데 특히 δ 1.15(H-13), 0.91(H-15) 및 0.86(H-14) 등 upfield에 위치한 singlet methyl peaks들과 인접한 탄소들과의 H-C correlations에 의하여 A와 B ring의 대부분 구조가 결정되었다.

전기한 α, β -unsaturated carbonyl기의 존재는 δ 8.60에 위치한 수소 signal과 δ 188.9 및 122.8에 위치한 탄소 signals 간의 H-C correlation으로 규명되었다. 또한 후자의 탄소와 H-13과의 3-bond correlation에 의하여 β -hydroxy- α, β -unsaturated carbonyl기는 drimane 골격의 C-8, C-9 및 C-11에 위치하는 것으로 해석되었다. 이와 더불어 δ 188.9의 탄소와 δ 1.80(H-6eq)에 위치한 수소 사이에 나타난 3-bond correlation도 이러한 해석을 지지하였다. 이렇듯 HMBC 실험에 의하여 unsaturated carbonyl기의 탄소골격 상에서의 위치는 결정되었으나 실제의 배열에는 두 가지 가능성이 존재하였다. 즉 하나의 ketone과 하나의 enol이 각각 C-8과 C-11에 존재하는 것이 가능하였으나 이와 동시에 하나의 enol과 하나의 aldehyde가 각각 C-8과 C-11에 위치하는 것도 논리적으로 합당하였다. 이는 2D NMR 상에서 여러 개의 homo- 및 hetero-correlations가 발견되었음에도 불구하고 δ 188.9(C)와 183.0(CH)에 나타난 탄소들의 작용기를 완전히 구분하는 것이 불가능하였기 때문이다: β -hydroxy- α, β -unsaturated carbonyl기에 있어서 carbonyl기와 β -olefinic carbon은 거의 같은 ^{13}C NMR shifts를 나타낸다(Wehrli & Wirthlin, 1978; Kalinowski, *et al.*, 1988).

이 문제의 해결은 ^1H NMR 자료에서 δ 15.36과 8.60에 나타난 수소 signals 사이의 coupling constant의 측정에 의하여 해결되었다. 즉 이들간의 coupling constant가 상

당히 큰 값이었으므로($J = 4.4$ Hz) 전자의 경우, 즉 11-hydroxy-9(11)-unsaturated-8-ketone의 해석에 더욱 적합하였다(Fig. 3-148). 이 경우에는 두 수소원자는 각각 11-hydroxyl proton과 11-olefinic proton에 해당하므로 비록 둘 중에서 하나의 수소가 heteroatom에 결합되어 있기는 하나 vicinal carbons에 결합된 수소간의 coupling constant와 거의 유사한 값을 나타낼 수 있다(Jackman & Sternhell, 1969). 이와 반대로 후자의 경우, 즉 8-hydroxy-8(9)-unsaturated-11-aldehyde를 이루고 있을 경우에는 동일한 수소원자들은 각각 8-hydroxy proton과 11-aldehyde proton에 해당하게 된다. 그러나 이렇게 되면 수소원자들 간의 coupling 현상은 homoallylic coupling이 되는데 4.4 Hz의 H-H coupling constant는 이러한 coupling에 의한 것으로 보기에는 지나치게 큰 값이다. 이리하여 신물질 VJP-6-1의 구조는 넓은 의미로서 drimane계에 속하는 12-norsesquiterpenoid로 구조가 명확히 규명되었다(Fig. 3-121).

마지막으로 신물질 VJP-6-J가 백색의 고체로 분리되었으며 HRCIMS와 ^{13}C NMR 자료 해석에 의하여 분자식이 $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 로 결정되었다(Fig. 3-149). 이 물질의 NMR 자료로부터 두 개의 acetoxy기 존재가 쉽게 드러났으며 $\{^1\text{H} \delta 2.03(3\text{H}, \text{s}), 2.00(3\text{H}, \text{s}); ^{13}\text{C} \delta 171.3(\text{C}), 170.5(\text{C}), 21.4(\text{CH}_3), 21.0(\text{CH}_3)\}$ IR spectrum에서도 ester 특유의 강한 흡광 band가 1740 cm^{-1} 에서 관찰되었다(Fig. 3-150 and 3-151). 따라서 VJP-6-I의 경우와 마찬가지로 이 천연물 역시 완전한 sesquiterpene이 아닌 하나의 norsesquiterpenoid로 생각되었다.

이 물질의 NMR 자료를 다른 drimane계 천연물과 세밀히 비교해 본 결과 VJP-6-C와 여러 가지 면에서 유사한 것을 발견하였다. Norsesquiterpene으로 바뀜으로서 잃어버린 하나의 탄소 signal을 제외하고는 두 물질의 ^{13}C NMR 자료에서 두드러진 차이점은 VJP-6-C의 $\delta 63.9(\text{C-12})$ 와 $62.7(\text{C-8})$ 에 존재하던 두 개의 oxymethylenes 중의 하나가 VJP-6-J에서는 $\delta 69.2$ 에 위치한 하나의 oxymethine으로 바뀐 것 뿐으로서 대부분의 다른 탄소 signals의 위치나 multiplicity는 매우 유사하였다(Fig. 3-150). 동일한 현상이 ^1H NMR spectrum에서도 나타나 새로운 methine proton의 signal이 $\delta 5.12(1\text{H}, \text{ddd}, J = 3.4, 2.9, 2.9 \text{ Hz})$ 에서 발견되었다(Fig. 3-151). 이러한 현상을 종합하여 볼 때 물질 VJP-6-J는 VJP-6-C에서 C-11과 C-12 등 두 개의 부속지(side-chain)에 해당하였던 oxymethylenes 중의 하나가 제거되어 그 결과 이 곳에 결합되어 있던 acetoxy기 중의 하나가 직접 ring에 결합된 유도체로 생각되었다.

다른 천연물의 경우와 마찬가지로 VJP-6-J의 구조도 2D NMR 실험에 의하여 결정되었다. ^1H COSY 실험의 결과에 의하면 $\delta 1.53(1\text{H}, \text{ddd}, J = 10.7, 3.9, 3.4 \text{ Hz})$ 에 나타난 수소 signal은 $\delta 5.12(1\text{H}, \text{ddd}, J = 3.4, 2.9, 2.9 \text{ Hz})$, $4.14(1\text{H}, \text{dd}, J = 10.7, 3.9 \text{ Hz})$, $4.01(1\text{H}, \text{dd}, J = 10.7, 10.7 \text{ Hz})$ 등 downfield에 나타난 세 개의 signals (oxymethylene 및 oxymethine에 해당하는) 모두와 직접 연결되어 있음이 밝혀졌다. HMQC 실험에 의하여 $\delta 1.53$ 의 수소는 ^{13}C NMR spectrum 상에서 $\delta 51.5$ 에 위치한 methine carbon에 결합되어 있으며 HMBC 실험에서는 이 탄소와 $\delta 1.00(3\text{H}, \text{s}, \text{H-13})$ 에

나타난 수소 사이의 3-bond correlation이 드러났다. 그러므로 이 methine은 C-9으로 지정되었으며 drimane 골격 상에서의 위치로 보아 전기한 oxymethylene 및 oxymethine은 각각 C-11 및 C-8로 지정되었고 두 개의 acetoxy기 역시 이들 탄소에 접합되어 있는 것으로 해석되었다. 이러한 해석을 더욱 지지하는 증거로는 HMBC 실험에서 H-11 oxymethylene protons와 C-8 및 C-9 탄소간의 H-C long-range couplings가 발견된 것이다. Drimane계 물질에서 공통적으로 발견되는 *trans* A/B ring junction 이외에 새로 나타난 C-8과 C-9 비대칭 탄소 중심의 상대적 입체배열은 이들에 결합되어 있는 수소원자 사이의 작은 coupling constant($J_{8,9} = 3.4$ Hz)와 함께 H-9과 H-5(*trans* ring junction)으로부터 B ring에 대하여 axial, α -orientation으로 이미 결정되어 있음) 사이의 NOE 상관관계에 의하여 $85^\circ, 95^\circ$ 로 지정되었다. 이렇듯 신물질 VJP-6-J의 구조는 diacetoxy기를 가진 drimane계 12-norsesquiterpenoids로 명확히 규명되었다(Fig. 3-121).

문헌조사에 따르면 drimane 골격의 sesquiterpenoids는 주로 육상식물 특히 전통 약용식물로부터 다수 분리된 바 있다(Jansen, 1991). 반면 해양생물에서는 그 출현빈도가 훨씬 낮아 *Dysidea*를 비롯한 해면동물과 - 이들을 포식하는 것으로 추측되는 연체동물로부터 수종의 물질이 분리된 바 있을 뿐이다(Garson, *et al*, 1992; Butler & Capon, 1993; Montagnac, *et al*, 1996). 또한 문헌조사에 따르면 물질 VJP-6-I나 -J과 같은 norsesquiterpene 골격을 가진 물질은 해양생물과 육상생물 모두로부터 때때로 발견되고 있다. 그러나 본 연구에서 분리된 것과 같은 drimane골격의 천연물 중에서는 불과 몇 종의 11-nordrimane계 sesquiterpenoids만이 육상의 전통 약용식물 *Polygonium hydropiper*로부터 보고되어 있을 뿐이다(Fukuyama, *et al*, 1985). 더욱이 12-nordrimane sesquiterpenoids계 물질로는 본 연구에서 발견된 VJP-6-I와 -J가 육상과 해양을 망라하여 최초의 천연물들이다(Paul, *et al*, 1997).

알려진 해양천연물과 합성 유도체의 생리활성에 대한 조사에 따르면 drimane계 sesquiterpenoids 중에서는 항박테리아, 항진균, 세포독성 등의 활성을 가진 예가 보고되어 있다(Garson, *et al*, 1992). 본 연구에서 분리한 천연물의 생리활성을 측정할 결과 물질 VJP-6-B(polygodial)은 대단히 낮은 농도(IC_{50} 11.4 μ M)에서 열대어류에 공생하는 박테리아 *Photobacterium leiognathi*의 발광현상(bioluminescence)을 완전히 억제하였다. 그러나 동일한 실험에서 VJP-6-A, -F, -G, -J등은 낮은 저해활성(IC_{50} 90-145 μ M)을 나타내었다. Paper disk를 이용한 항미생물 검색에서도 VJP-6-B는 10 μ g/mL의 농도에서 *P. leiognathi*에 대하여 상당한 활성(inhibition zone 8 mm)을 보여주었다. 그 밖의 활성으로서는 VJP-6-B, -D, -F가 Na^+/K^+ -ATPase에 대하여 약한 저해활성을 나타내었으며(각각 IC_{50} 82, 98, 45 μ M) VJP-6-F는 PLA₂에 대해서도 약한 저해활성(IC_{50} 113 μ M)을 나타내었다. 그러나 동일한 실험에서 다른 천연물은 활성을 전혀 나타내지 못하였다.

의약활성 이외에도 drimane sesquiterpenoids는 화학생태학적 측면에서 잠재적

포식자에 대한 포식저해(antifeeding) 활성을 나타내는 것이 알려져 있다(Jansen & de Groot, 1991). 원래 매운 맛으로 널리 알려진 VJP-6-B(polygodial)은 육상의 곤충과 해양의 육식성 어류에 대하여 대단히 강한 포식저해 효과를 가지고 있다(Kubo, et al, 1976; Cimino, et al, 1985; Caprioli, et al, 1987). 의약활성과 더불어 본 연구에서 수행한 생태학 실험 결과 *Dysidea* sp.의 조추출물과 정제된 VJP-6-A (7-deacetoxyolepupane)은 모두 이 해면과 동일한 환경에 서식하는 어류에 대하여 매우 강한 포식저해 활성을 나타내었다(Thacker, et al, 1998). 그러나 다른 천연물에 대해서는 분리된 시료의 양이 적어 화학적 방어 역할을 아직 검증하지 못하고 있다.

3. 실험방법

가. 시료의 채집, 동정, 유기물질의 추출과 flash chromatography

해면 *Dysidea* sp. (시료번호 VJP-6)은 1996년 7월 Guam 섬 서해안의 Apra Harbor에 부속된 Sponge Mound라 불리는 지역의 수심 20-25 m에서 SCUBA로 채집되었다. 이 시료의 형태적 특징에 대하여 Prof. P. R. Bergquist의 소견은 다음과 같다. "The sponge had an encrusting morphology covering areas of 4 x 3 in. and producing upright lobes. Color of both the exterior and interior was dark grey in life and deep brown in spirit. The texture is friable, delicate, and easily torn. The surface is strongly conulose, each conule having a single, apical primary fiber extending from it and accessory lateral conules and fibers. As a result of the heavy content of coring material in the primary fibers, the sponge surface appears to have a whitish tracery. Oscules are not evident in the specimens, and the surface membrane between conules is smooth macroscopically but supports a thin superficial layer of uniformly sized sand grains. This layer is enhanced to 100 μ m deep on conule surface and tips. The skeleton has a rectangular arrangement with simple primary fibers oriented to the conules, of even diameter(60-120 μ m) throughout the body of the sponge and packed with sand grains, leaving very little clear spongin evident. Fiber construction is stratified, and secondary fibers are oriented at right angles to the primaries, unbranched and cored to half the fiber diameter. The tissue is evenly infiltrated with pigment cells and shows no collagen enhancement near the surface or around canals. There are no evident algal or cyanobacterial symbionts. Choanocyte chambers are oval, 40 μ m in longest dimension." (Bergquist, personal commun.; Paul, et al, 1997). 이 시료의 표본은 현재 영국의

British Museum of Natural History(BMNH)에 Dr. M. Kelley-Borges의 관할 하에 전시되어 있다 (표본 번호 1997. 5. 13. 1).

채집된 시료는 동결 건조와(건조 중량 25 g) 분쇄를 시킨 후 CH_2Cl_2 (1 L x 3)와 MeOH(1 L x 2)로 반복하여 추출하였다. 각각의 추출액을 합한 후 감압증류하여 용매를 제거한 조추출물(3.6 g)에 대해서 silica vacuum flash chromatography를 하였다. 용리액은 100% *n*-hexane 으로부터 시작하여 100% EtOAc에 이르기까지 매 분획마다 5%씩 EtOAc의 양을 증가시키는 gradient system을 사용하였다. 이러한 방법으로 얻어진 총 21개의 분획의 각각에 대하여 ^1H NMR과 TLC 분석을 하여 이차대사물질의 존재를 확인하였다. 그 결과 비극성에서 중정도 극성에 이르는 여러 분획(10% - 35% EtOAc/hexane)에 이차대사물질이 넓게 분포하는 것이 발견되었다. 따라서 이들은 극성이 비슷한 세 가지 그룹(10-15%; 20-25%; 30-35% EtOAc/hexane)으로 나누어 천연물의 분리를 시도하였다.

나. 천연물의 분리정제

Silica flash chromatography로부터 획득한 분획 3과 4(10%와 15% EtOAc/hexane 으로 용출)를 합하여 용매를 감압 하에서 제거한 후 잔류물에 대하여 silica semi-preparative HPLC(YMC silica column 1 cm x 25 cm, 4 mL/min, 12% EtOAc/hexane, RI detector)로 물질 VJP-6-A, -C, -G를 VJP-A, -G, -C의 순(retention time)으로 순수하게 분리하였다. 분리된 물질의 양은 VJP-6-A, -C, -G가 각각 465.0, 31.2, 2.2 mg 이었다. Flash chromatography의 분획 5와 6(20%와 25% EtOAc/hexane)을 합하여 silica semi-preparative HPLC(동일한 column, 15% EtOAc/hexane)으로 분리한 결과 용출 순서대로 VJP-6-F, -D, -E, -I, -J, -B 등 여섯 종의 물질이 분리되었다. 이들은 다시 C_{18} reversed-phase HPLC(YMC *J'* sphere ODS-H80 column, 1 cm x 25 cm, 2.0 mL/min, 100% CH_3CN)으로 정제되어 각각 6.7, 10.4, 9.1, 10.5, 6.3, 및 16.0 mg의 순수한 VJP-6-B, -D, -E, -F, -I, -J가 얻어졌다. 한편 silica flash chromatography에서 중정도 극성의 용매로 용출된 분획(30-35% EtOAc/hexane)에 대해서도 용매의 제거와 silica HPLC(동일한 column, 15% EtOAc/HPLC)에 의한 천연물의 분리와 reversed-phase HPLC(100% CH_3CN)에 의한 정제를 한 결과 순수한 물질 VJP-6-B와 -H가 각각 24.6과 3.1 mg 얻어졌다.

7-Deacetoxyoleupane (VJP-6-A): white solid; mp 79-80 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -153.9° (c1.0, MeOH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.27 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-11), 6.02 (1H, dd, J = 2.0, 2.0 Hz, H-12), 2.45 (1H, ddd, J = 14.2, 4.9, 1.5 Hz, H-7eq), 2.25 (1H, br s, H-9), 2.04 (3H, s, Ac), 1.97 (1H, br ddd, J = 13.2, 13.2, 6.8 Hz, H-7ax), 1.67 (1H, m, H-6eq), 1.64 (1H, br dd, J = 12.7, 3.4 Hz, H-1eq), 1.53 (1H, dddd, J =

13.7, 13.7, 13.2, 3.4, 2.9 Hz, H-2ax), 1.42 (1H, m, H-2eq), 1.40 (1H, m, H-3eq), 1.23 (1H, dddd, $J = 13.2, 12.2, 12.2, 4.9$ Hz, H-6ax), 1.16 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.9$ Hz, H-3ax), 1.06 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.4$ Hz, H-1ax), 0.97 (1H, dd, $J = 12.8, 2.4$ Hz, H-5), 0.86 (3H, s, H-15), 0.80 (3H, s, H-14), 0.78 (3H, s, H-13). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.4 (C, OAc), 134.2 (CH, C-12), 114.3 (C, C-8), 98.1 (CH, C-11), 63.7 (CH, C-9), 52.9 (CH, C-5), 42.0 (CH_2 , C-3), 39.3 (CH_2 , C-1), 36.7 (C, C-10), 33.3 (CH_3 , C-15), 32.9 (C, C-4), 23.0 (CH_2 , C-7), 22.5 (CH_2 , C-6), 21.5 (CH_3 , C-14), 20.8 (CH_3 , OAc), 18.4 (CH_2 , C-2), 13.7 (CH_3 , C-13); HREIMS $[\text{M}]^+$ m/z 278.1871 (calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$, 278.1882); LRMS m/z (relative intensity) 278 (2), 219 (47), 218 (73), 203 (92), 175 (15), 147 (14), 137 (922), 123 (28), 109 (31), 95 (39), 81 (65).

Polygodial (VJP-6-B): white solid; mp 53-55 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -123.4° (c 0.3, EtOH); IR (KBr) ν_{max} 3450 (broad, -OH), 2930, 2850, 1720 (-CHO), 1680 (unsaturated aldehyde), 1460, 1370, 1070 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 9.50 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-11), 9.43 (1H, s, H-12), 7.10 (1H, ddd, $J = 5.4, 2.4, 2.4$ Hz, H-7), 2.80 (1H, br s, H-9), 2.48 (1H, ddd, $J = 20.5, 5.4, 4.4$ Hz, H-6eq), 2.29 (1H, dddd, $J = 20.5, 12.2, 3.9, 2.4$ Hz, H-6ax), 1.81 (1H, ddd, $J = 13.2, 4.9, 2.9$ Hz, H-1eq), 1.50 (2H, m, H-2), 1.44 (1H, m, H-3eq), 1.35 (1H, ddd, $J = 13.2, 12.7, 3.9$ Hz, H-1ax), 1.24 (1H, dd, $J = 12.2, 4.4$ Hz, H-5), 1.21 (1H, m, H-2ax), 0.93 (3H, s, H-14), 0.92 (3H, s, H-13), 0.89 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 201.9 (CH, C-11), 193.2 (CH, C-12), 154.3 (CH, C-7), 138.2 (C, C-8), 60.3 (CH, C-9), 48.9 (CH, C-5), 41.7 (CH_2 , C-3), 39.5 (CH_2 , C-1), 36.8 (C, C-10), 33.1 (C, C-4), 33.1 (CH_3 , C-15), 25.2 (CH_2 , C-6), 21.9 (CH_3 , C-14), 18.0 (CH_2 , C-2), 15.2 (CH_3 , C-13); HMBC correlations H-1eq/C-2; H-5/C-6, C-9, C-10, C-13, C-14, C-15; H-6eq/C-5, C-7, C-8, C-10; H-6ax/C-5, C-7, C-8; H-7/C-5, C-6, C-9, C-12; H-11/C-9; H-12/C-8, C-9; H-13/C-1, C-5, C-9, C-10; H-14/C-5; H-15/C-3, C-4, C-5, C-14; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 252.1949 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$, 252.1963); LRMS m/z (relative intensity) 252 (59), 235 (M+H, 100), 222 (10), 205 (14), 109 (19), 98 (15), 61 (27).

VJP-6-C: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ +37.2° (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.26 (1H, dd, $J = 11.2, 5.4$ Hz, H-11), 4.12 (1H, dd, $J = 10.7, 10.3$ Hz, H-12), 4.05 (1H, br d, $J = 10.7$ Hz, H-12), 4.03 (1H, dd, $J = 11.2, 9.3$ Hz, H-11), 2.15 (1H, m, H-8), 2.02 (6H, s, OAc x 2), 1.85 (1H, br dd, $J = 13.2, 2.0$ Hz, H-7eq), 1.67 (1H, ddd, $J = 9.3, 5.4, 5.4$ Hz, H-9), 1.60 (1H, br d, $J = 12.7$ Hz, H-1eq), 1.54 (1H, br ddd, $J = 13.7, 3.4, 3.4$ Hz, H-2eq), 1.51 (1H, m, H-6eq), 1.42 (2H, m, H-2ax, -7ax), 1.36 (1H, m, H-3eq), 1.30 (1H, dddd, $J = 13.2, 13.2, 12.7, 3.4$ Hz,

H-6ax), 1.13 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.9$ Hz, H-3ax), 1.02 (1H, ddd, $J = 12.7, 12.7, 3.4$ Hz, H-1ax), 0.89 (1H, dd, $J = 12.2, 2.0$ Hz, H-5), 0.83 (3H, s, H-15), 0.81 (3H, s, H-13), 0.78 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.2 (C x 2, OAc), 63.9 (CH_2 , C-12), 62.6 (CH_2 , C-11), 56.2 (CH, C-5), 51.4 (CH, C-9), 41.8 (CH_2 , C-3), 39.1 (CH_2 , C-1), 37.1 (C, C-10), 34.9 (CH, C-8), 33.4 (CH_3 , C-15), 33.2 (C, C-4), 29.1 (CH_2 , C-7), 21.5 (CH_3 , C-14), 21.1 (CH_3 x 2, OAc), 18.4 (CH_2 , C-2), 17.5 (CH_2 , C-6), 16.4 (CH_3 , C-13); NOESY correlations H-1ax/H-5, H-1ax/H-5, H-1ax/H-5, H-1ax/H-9, H-1ax/H-11(δ 4.26), H-3ax/H-15, H-5/H-9; H-6ax/H-14; H-6eq/H-15; H-8/H-9; H-11(δ 4.26)/H-12(δ 4.05); H-12(δ 4.05)/H-13; H-12(δ 4.12)/H-13; HMBC correlations H-9/C-11, C-12, C-13; H-11(δ 4.26)/C-8, C-9, 11-Ac; H-12(δ 4.12)/C-7, 12-Ac; H-13/C-1, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-5; H-15/C-3, C-4, C-5, C-14; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 342.2630 (calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_4$, 342.2644); LRMS m/z (relative intensity) 342 (17), 325 (12), 265 (16), 223 (22), 205 (100), 189 (13), 149 (22), 109 (13).

VJP-6-D: colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -7.2^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 221 (log ϵ 3.65) nm; IR (KBr) ν_{max} 2930, 2850, 1780 (unsaturated γ -lactone), 1760, 1210, 1010, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.95 (1H, dd, $J = 1.9, 1.5$ Hz, H-11), 2.40 (1H, br dd, $J = 18.6, 6.4$ Hz, H-7eq), 2.17 (1H, dddd, $J = 18.6, 11.2, 6.8, 1.5$ Hz, H-7ax), 2.11 (3H, s, OAc), 1.91 (1H, br dd, $J = 13.7, 6.8$ Hz, H-6eq), 1.63 (1H, br dddd, $J = 13.7, 13.7, 13.2, 2.9$, H-2ax), 1.53 (2H, m, H-1eq, -6ax), 1.47 (3H, m, H-1ax -2eq, -3eq), 1.32 (1H, dd, $J = 12.7, 2.0$ Hz, H-5), 1.22 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.4$ Hz, H-3ax), 1.16 (3H, s, H-13), 0.94 (3H, s, H-15), 0.88 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.9 (C, C-12), 169.1 (C, OAc), 165.6 (C, C-9), 128.4 (C, C-8), 90.7 (CH, C-11), 50.9 (CH, C-5), 41.4 (CH_2 , C-3), 37.3 (C, C-10), 34.5 (CH_2 , C-1), 33.3 (C, C-4), 33.3 (CH_3 , C-15), 21.7 (CH_3 , C-13), 21.4 (CH_2 , C-7), 21.4 (CH_3 , C-14), 20.9 (CH_3 , OAc), 18.2 (CH_2 , C-2), 18.0 (CH_2 , C-6); NOESY correlations H-2ax/H-13, H-2ax/H-14, H-5/H-15, H-6eq/H-15, H-11/H-13, H-13/H-14; HMBC correlations H-5/C-6, C-9, C-10; H-6eq/C-5, C-7, C-8, C-10; H-7ax/C-6, C-8, C-9; H-7eq/C-5, C-6, C-8, C-9; H-11/C-8, C-12, C-OAc; H-13/C-1, C-5, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-5; H-15/C-3, C-4, C-5; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 310.2025 (calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_4$, 310.2018); LRMS m/z (relative intensity) 310 (100), 252 (52), 253 (9), 250 (10), 235 (25), 203 (8).

VJP-6-E: colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -40.1^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 223 (log ϵ 3.78) nm; IR (KBr) ν_{max} 2930, 2870, 1770, 1350, 1190, 960 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.90 (1H, ddd, $J = 3.4, 3.4, 3.4$ Hz, H-7), 6.43 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-11), 2.68 (1H, m, H-9), 2.42 (1H, dddd, $J = 20.6, 5.4, 3.4, 3.4$ Hz, H-6eq), 2.12 (3H, s,

OAc), 2.09 (1H, dddd, $J = 20.6, 11.7, 3.4, 3.4$ Hz, H-6ax), 1.61 (1H, br d, $J = 13.2$ Hz, H-1eq), 1.52 (1H, m, H-2ax), 1.47 (2H, m, H-2eq, -3eq), 1.36 (1H, dd, $J = 11.7, 5.4$ Hz, H-5), 1.21 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.7, 3.4$ Hz, H-3ax), 1.19 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.4$ Hz, H-1ax), 0.91 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-15), 0.84 (3H, s, H-13); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.1 (C, OAc), 166.6 (C, C-12), 137.6 (CH, C-7), 126.3 (C, C-8), 93.5 (CH, C-11), 56.1 (CH, C-9), 49.3 (CH, C-5), 42.0 (CH_2 , C-3), 38.7 (CH_2 , C-1), 33.9 (C, C-10), 33.0 (CH_3 , C-15), 32.9 (C, C-4), 25.0 (CH_2 , C-6), 21.2 (CH_3 , C-14), 20.9 (CH_3 , OAc), 18.1 (CH_2 , C-2), 14.2 (CH_3 , C-13); NOESY correlations H-1ax/H-9, H-2ax/H-14, H-3ax/H-5, H-3ax/H-15, H-5/H-9, H-5/H-15, H-6ax/H-14, H-6eq/H-15, H-11/H-13; HMBC correlations H-5/C-6, C-9, C-13, C-14, C-15; H-6ax/C-5; H-6eq/C-8, C-10; H-9/C-7, C-10, C-13; H-11/C-9, C-10, C-12, OAc: H-13/C-1, C-5, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-5; H-15/C-3, C-4, C-5; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 310.2015 (calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_4$, 310.2018); LRMS m/z (relative intensity) 310 (12), 293 (8), 279 (6), 233 (100), 124 (5), 109 (15).

VJP-6-F: white solid; mp 75-76 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -14.4° (c 0.3, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 2950, 2860, 1765 (ester), 1460, 1350, 1150, 1090, 990 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.23 (1H, dd, $J = 8.3, 6.4$ Hz, H-12), 3.66 (1H, dd, $J = 11.2, 8.3$ Hz, H-12), 2.43 (1H, ddd, $J = 13.2, 4.9, 3.4$ Hz, H-1eq), 2.34 (1H, m, H-8), 1.95 (1H, dddd, $J = 12.2, 3.4, 3.4, 2.9$ Hz, H-7eq), 1.74 (1H, dddd, $J = 13.2, 3.4, 3.4, 2.9$ Hz, H-6eq), 1.69 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H-9), 1.61 (1H, dddd, $J = 13.7, 13.2, 13.2, 3.4, 3.4$ Hz, H-2ax), 1.45 (1H, m, H-2eq), 1.42 (1H, m, H-3eq), 1.28 (1H, dddd, $J = 13.7, 13.2, 12.7, 3.9$ Hz, H-6ax), 1.19 (2H, m, H-3ax, -7ax), 1.07 (1H, br ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.4$ Hz, H-1ax), 0.98 (3H, s, H-13), 0.90 (1H, dd, $J = 13.2, 2.9$ Hz, H-5), 0.85 (3H, s, H-15), 0.81 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.8 (C, C-11), 71.2 (CH_2 , C-12), 57.4 (CH, C-9), 55.5 (CH, C-5), 42.3 (CH_2 , C-3), 38.3 (CH, C-8), 37.2 (CH_2 , C-1), 35.7 (C, C-10), 33.5 (CH_3 , C-15), 33.1 (C, C-4), 28.7 (CH_2 , C-7), 21.2 (CH_2 , C-6), 21.2 (CH_3 , C-14), 18.2 (CH_2 , C-2), 15.5 (CH_3 , C-13); NOESY correlations H-2ax/H-13, H-2ax/H-14, H-3ax/H-15, H-3eq/H-14, H-3eq/H-15, H-5/H-9, H-6ax/H-13, H-6ax/H-14, H-6eq/H-15, H-8/H-13, H-13/H-14; HMBC correlations H-2ax/C-1; H-7ax/C-6; H-8/C-12; H-9/C-1, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13; H-12/C-7, C-8, C-9, C-11; H-13/C-1, C-5, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-5, C-14; H-15/C-3, C-4, C-5, C-15; HREIMS $[\text{M}]^+$ m/z 236.1771 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236.1776); LRMS m/z (relative intensity) 236 (21), 221 (100), 180 (38), 175 (10), 161 (10), 153 (20), 120 (25), 81 (19).

VJP-6-G: colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -21.6° (c 0.3, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 2930, 1460, 1370, 1240, 1120, 1050, 990 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.72 (1H, br s, H-11).

3.96 (1H, dd, $J = 9.3, 7.8$ Hz, H-12), 3.56 (1H, dd, $J = 11.2, 7.8$ Hz, H-12), 3.28 (3H, s, OMe), 2.59 (1H, m, H-8), 1.70 (1H, m, H-1eq), 1.67 (1H, m, H-7eq), 1.64 (1H, br d, $J = 7.3$ Hz, H-9), 1.61 (1H, m, H-7ax), 1.56 (1H, m, H-2ax), 1.46 (1H, dddd, $J = 13.7, 2.9, 2.9, 2.1$ Hz, H-6eq), 1.39 (1H, m, H-3eq), 1.37 (1H, m, H-2eq), 1.26 (1H, dddd, $J = 13.7, 13.2, 12.2, 4.4$ Hz, H-6ax), 1.16 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.2, 3.9$ Hz, H-3ax), 1.04 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.2, 3.9$ Hz, H-1ax), 0.90 (3H, s, H-13), 0.86 (3H, s, H-15), 0.82 (3H, s, H-14), 0.80 (1H, dd, $J = 12.2, 2.1$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 107.2 (CH, C-11), 72.2 (CH_2 , C-12), 58.8 (CH, C-9), 54.3 (CH_3 , OMe), 52.4 (CH, C-5), 41.9 ($\text{CH}_2 \times 2$, C-1, -3), 34.3 (C, C-10), 34.1 (CH, C-8), 33.5 (CH_3 , C-15), 33.0 (C, C-4), 23.9 (CH_2 , C-7), 22.0 (CH_3 , C-14), 18.3 (CH_2 , C-2), 17.9 (CH_2 , C-6), 16.0 (CH_3 , C-13); NOESY correlations H-5/H-9, H-6ax/H-13, H-8/H-12 (δ 3.96), H-11/H-13, H-11/OMe, H-12 (δ 3.56)/H-13, H-13/H-14 HMBC correlations H-1ax/ C-13; H-6ax/C-5; H-9/C-1, C-10, C-11, C-13; H-11/C-8, C-9, C-12, C-OMe; H-12/C-7, C-8, C-9; H-13/C-1, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-14; H-15/C-3, C-4, C-5, C-15; OMe/C-11; HREIMS $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+ m/z$ 221.1908 (calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}$, 221.1905); LRMS m/z (relative intensity) 221 (67), 205 (100), 190 (24), 180 (30), 177 (68), 164 (38), 135 (20), 123 (27), 109 (13), 69 (36).

VJP-6-H: colorless gum; $[\alpha]_D^{25} +2.8^\circ$ (c 0.2, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3450 (broad, -OH) 2930, 2870, 1455, 1380, 1100, 1020 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.15 (1H, br s, H-12), 4.66 (1H, br s, H-11), 3.36 (3H, s, OMe), 2.00 (1H, ddd, $J = 13.7, 3.9, 2.4$ Hz, H-7eq), 1.80 (1H, br s, H-9), 1.71 (1H, ddd, $J = 13.2, 4.9, 2.9$ Hz, H-1eq), 1.61 (1H, m, H-6eq), 1.55 (1H, m, H-2ax), 1.51 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.7, 5.9$ Hz, H-7ax), 1.42 (2H, m, H-2eq, -3eq), 1.21 (1H, m, H-6ax), 1.17 (1H, m, H-3ax), 1.09 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 2.4$ Hz, H-1ax), 0.96 (1H, dd, $J = 12.2, 2.0$ Hz, H-5), 0.89 (3H, s, H-15), 0.87 (3H, s, H-13), 0.80 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 105.4 (CH, C-11), 102.2 (CH, C-12), 76.9 (C, C-8), 65.1 (CH, C-9), 54.3 (CH_3 , OMe), 52.2 (CH, C-5), 41.7 (CH_2 , C-3), 41.3 (CH_2 , C-1), 35.0 (C, C-10), 33.5 (CH_3 , C-15), 32.9 (C, C-4), 30.9 (CH_2 , C-7), 21.9 (CH_3 , C-14), 18.7 (CH_2 , C-6), 18.4 (CH_2 , C-2), 15.3 (CH_3 , C-13); NOESY correlations H-1ax/H-9, H-1eq/H-11, H-1eq/H-13, H-2ax/H-14, H-5/H-9, H-6ax/ H-12, H-6ax/H-13, H-6ax/H-14, H-6eq/H-15, H-11/H-13, H-11/OMe, H-12/H-13; HMBC correlations H-5/C-4, C-6, C-7, C-10, C-13; H-7ax/ C-6, C-8, C-12; H-7eq/C-5, C-9; H-9/C-1, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13; H-11/C-8, C-10, C-12, C-OMe; H-12/C-8, C-11; H-13/C-1, C-5, C-9, C-10; H-14/C-3, C-4, C-5, C-15; H-15/C-3, C-4, C-5, C-14; OMe/C-11; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+ m/z$ 284.2217 (calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$, 284.2225).

VJP-6-I: white solid; mp 79-80 °C: $[\alpha]_D^{25} +9.6^\circ$ (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} 294 (log ϵ 3.34) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3500 (broad, -OH), 2930, 2870, 1620 (C=O stretching of β -hydroxy- α , β -unsaturated ketone), 1590, 1460, 1380, 1290, 1200, 940 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 15.36 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, 11-OH), 8.60 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-11), 2.48 (1H, ddd, $J = 19.8, 7.0, 1.8$ Hz, H-7eq), 2.39 (1H, ddd, $J = 19.8, 11.0, 7.7$ Hz, H-7ax), 2.01 (1H, br d, $J = 12.7$ Hz, H-1eq), 1.80 (1H, br ddd, $J = 13.6, 7.7, 1.8$ Hz, H-6eq), 1.63 (1H, m, H-2ax), 1.58 (1H, m, H-6ax), 1.53 (1H, m, H-2eq), 1.45 (1H, dddd, $J = 13.6, 3.3, 3.3, 1.5$ Hz, H-3eq), 1.30 (1H, ddd, $J = 12.7, 12.7, 3.7$ Hz, H-1ax), 1.20 (1H, m, H-3ax), 1.16 (1H, dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-5), 1.15 (3H, d, $J = 0.7$ Hz, H-13), 0.91 (3H, s, H-15), 0.86 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 188.9 (C, C-8), 183.0 (CH, C-11), 122.8 (C, C-9), 50.3 (CH, C-5), 41.4 (CH_2 , C-3), 38.3 (CH_2 , C-1), 35.3 (C, C-10), 33.3 (CH_3 , C-15), 33.1 (CH_2 , C-7), 32.9 (C, C-4), 25.0 (CH_3 , C-13), 21.3 (CH_3 , C-14), 18.9 (CH_2 , C-2), 17.7 (CH_2 , C-6); HMBC correlations H-6ax/C-5: H-6eq/C-8: H-7ax/C-6: C-8: H-7eq/C-5, C-6, C-8: H-11/ C-8, C-9: H-13/C-1, C-5, C-9, C-10: H-14/C-3, C-4, C-5, C-15: H-15/ C-3, C-4, C-5, C-14; HREIMS $[\text{M}]^+ m/z$ 222.1614 (calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 222.1619); LRMS m/z (relative intensity) 222 (11), 207 (100), 189 (26), 179 (28), 149 (15), 137 (15), 111 (13).

VJP-6-J: white solid; mp 84-85 °C: $[\alpha]_D^{25} +36.0^\circ$ (*c* 0.2, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 2950, 2870, 1740, 1370, 1250, 1000 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.12 (1H, ddd, $J = 3.4, 2.9, 2.9$ Hz, H-8), 4.14 (1H, dd, $J = 10.7, 3.9$ Hz, H-11), 4.01 (1H, dd, $J = 10.7, 10.7$ Hz, H-11), 2.03 (3H, s, 8-OAc), 2.00 (3H, s, 11-OAc), 1.99 (1H, br ddd, $J = 13.2, 2.9, 2.9$ Hz, H-7eq), 1.72 (1H, br dd, $J = 13.2, 3.4$ Hz, H-1eq), 1.58 (1H, dddd, $J = 13.7, 13.7, 13.2, 3.4, 3.4$ Hz, H-2ax), 1.53 (1H, ddd, $J = 10.7, 3.9, 3.4$ Hz, H-9), 1.48 (2H, m, H-6eq, -7ax), 1.43-1.39 (3H, m, H-2eq, -3eq, -6ax), 1.16 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.7, 3.4$ Hz, H-3ax), 1.04 (1H, ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.4$ Hz, H-1ax), 1.00 (3H, s, H-13), 0.90 (1H, dd, $J = 11.7, 2.0$ Hz, H-5), 0.86 (3H, s, H-15), 0.84 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.3 (C, OAc), 170.5 (C, OAc), 69.2 (CH, C-8), 61.0 (CH_2 , C-11), 55.3 (CH, C-5), 51.5 (CH, C-9), 41.8 (CH_2 , C-3), 39.5 (CH_2 , C-1), 37.0 (C, C-10), 33.6 (CH_3 , C-15), 33.2 (C, C-4), 31.5 (CH_2 , C-7), 21.7 (CH_3 , C-14), 21.4 (CH_3 , OAc), 21.0 (CH_3 , OAc), 18.3 (CH_2 , C-2), 17.3 (CH_2 , C-6), 13.0 (CH_3 , C-13); HMBC correlations H-5/C-4, C-6: H-11/C-8, C-9, 11-OAc: H-13/C-1, C-5, C-9, C-10: H-14/ C-3, C-4, C-5: H-15/C-3, C-4, C-5, C-14; HRCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ m/z$ 328.2494 (calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{NO}_4$, 328.2487); LRMS m/z (relative intensity) 328 (12), 251 (20), 191 (100), 175 (6), 135 (7), 121 (6), 109 (22), 95 (12).

File:3189718B Ident:12 Mer Def 0.25 Acq:18-MAR-1997 15:46:51 +1:24 Cal:3189701B_1
70S EI+ Magnet BpM:43 BpI:9580051 TIC:166654112 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) VJP-6-L DEI

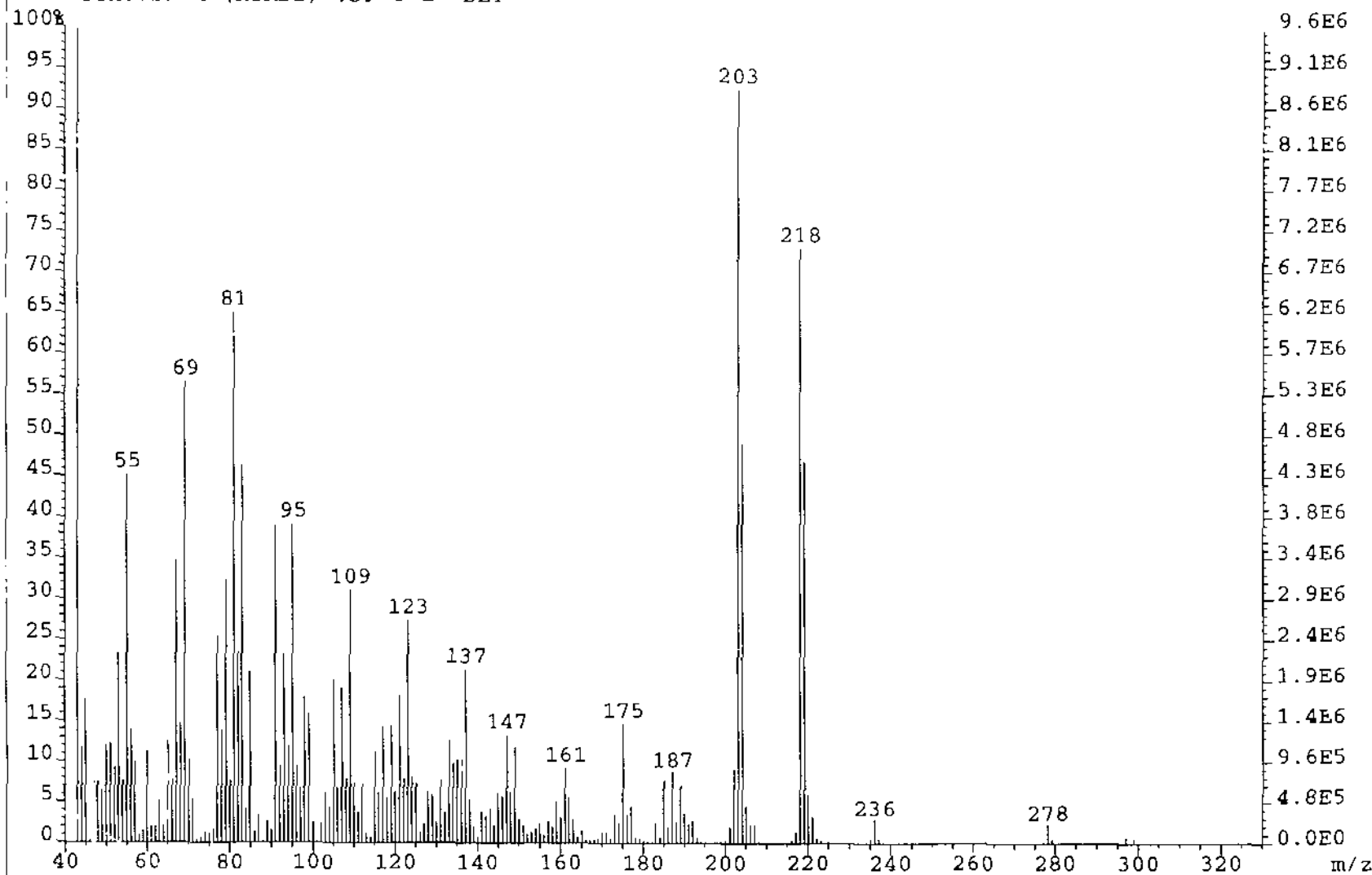


Fig. 3-122. HRMS spectrum of compound VJP-6-A.

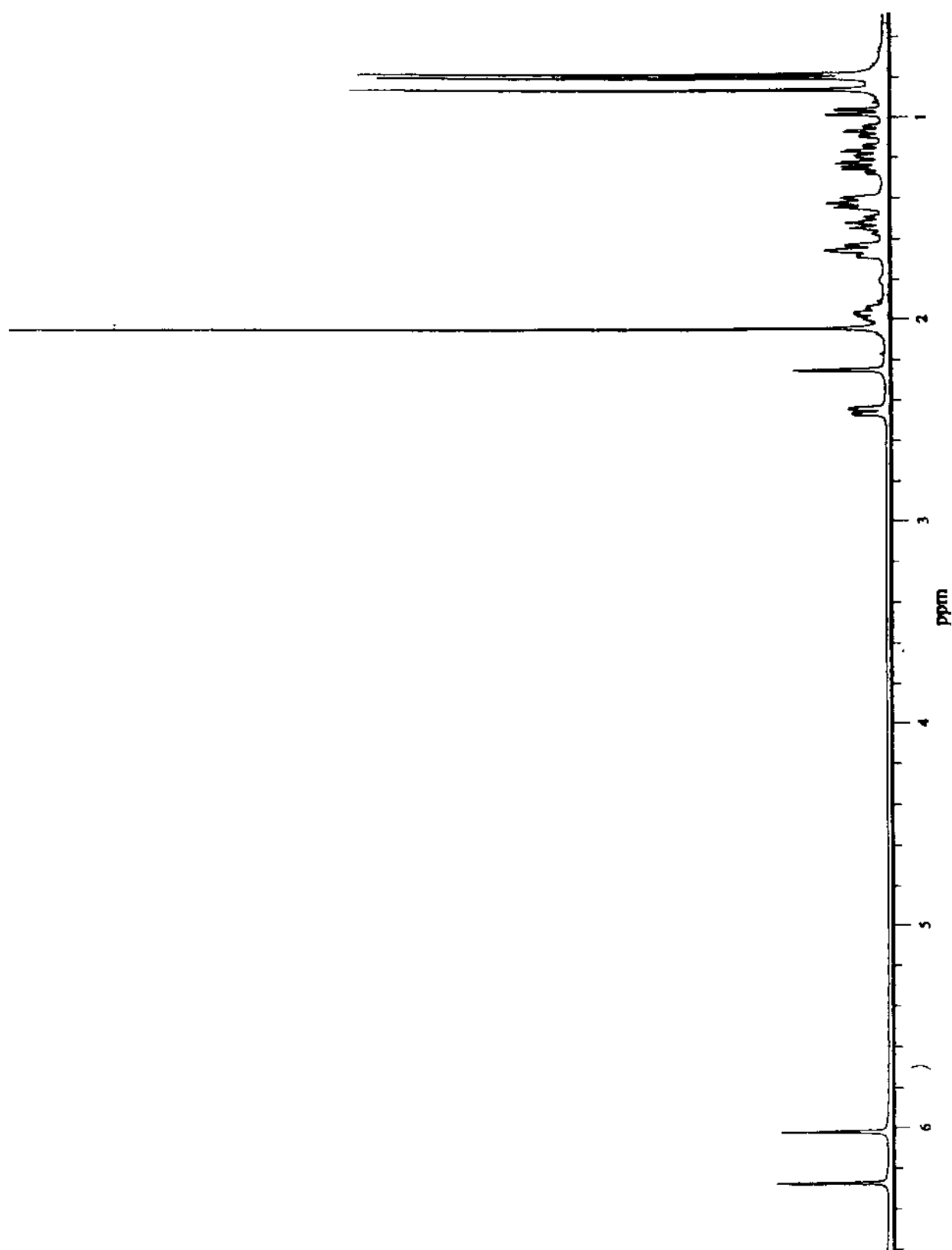


Fig. 3-123. Proton NMR spectrum of compound **VJP-6-A**.

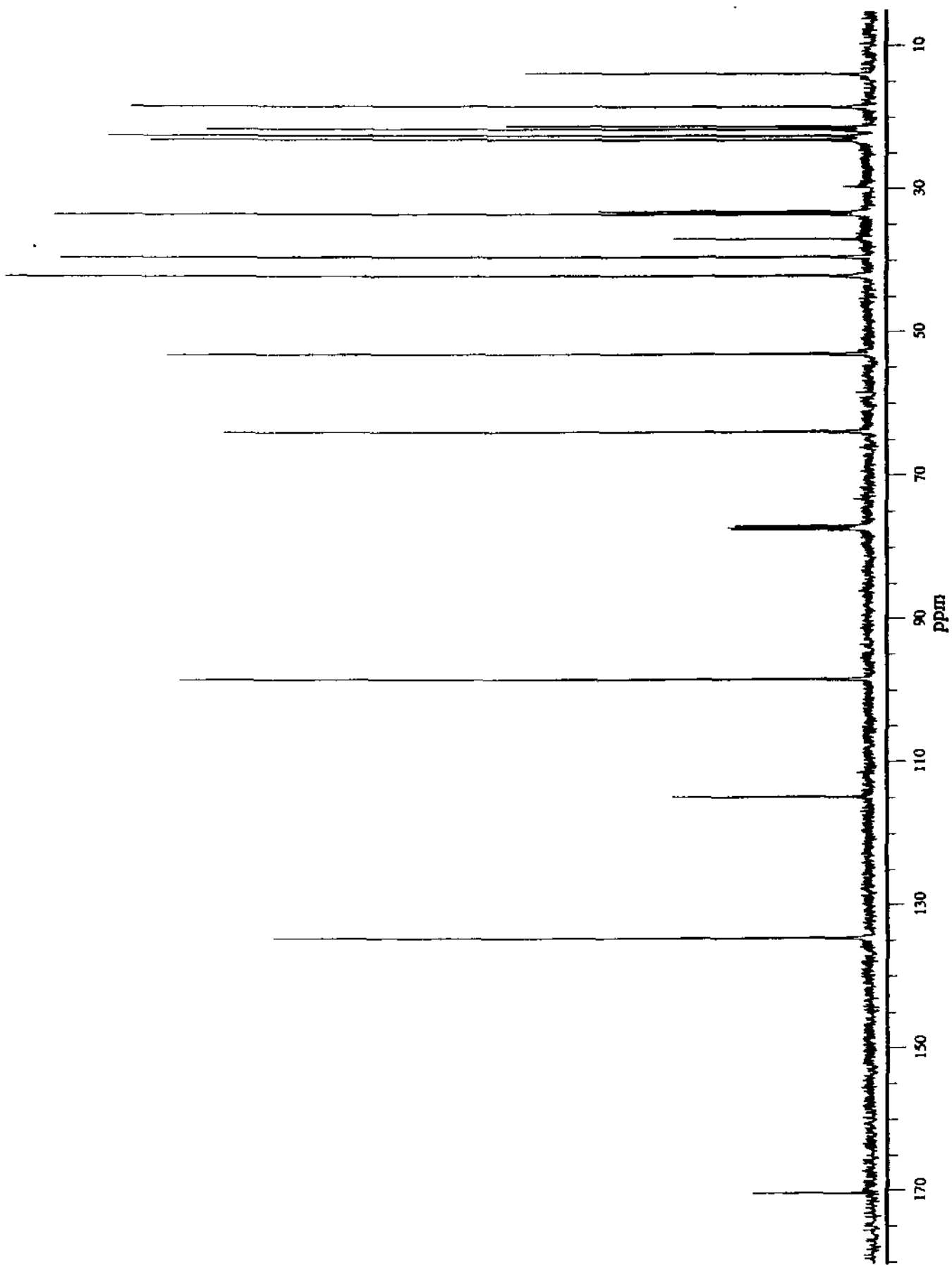


Fig. 3-124. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-A.

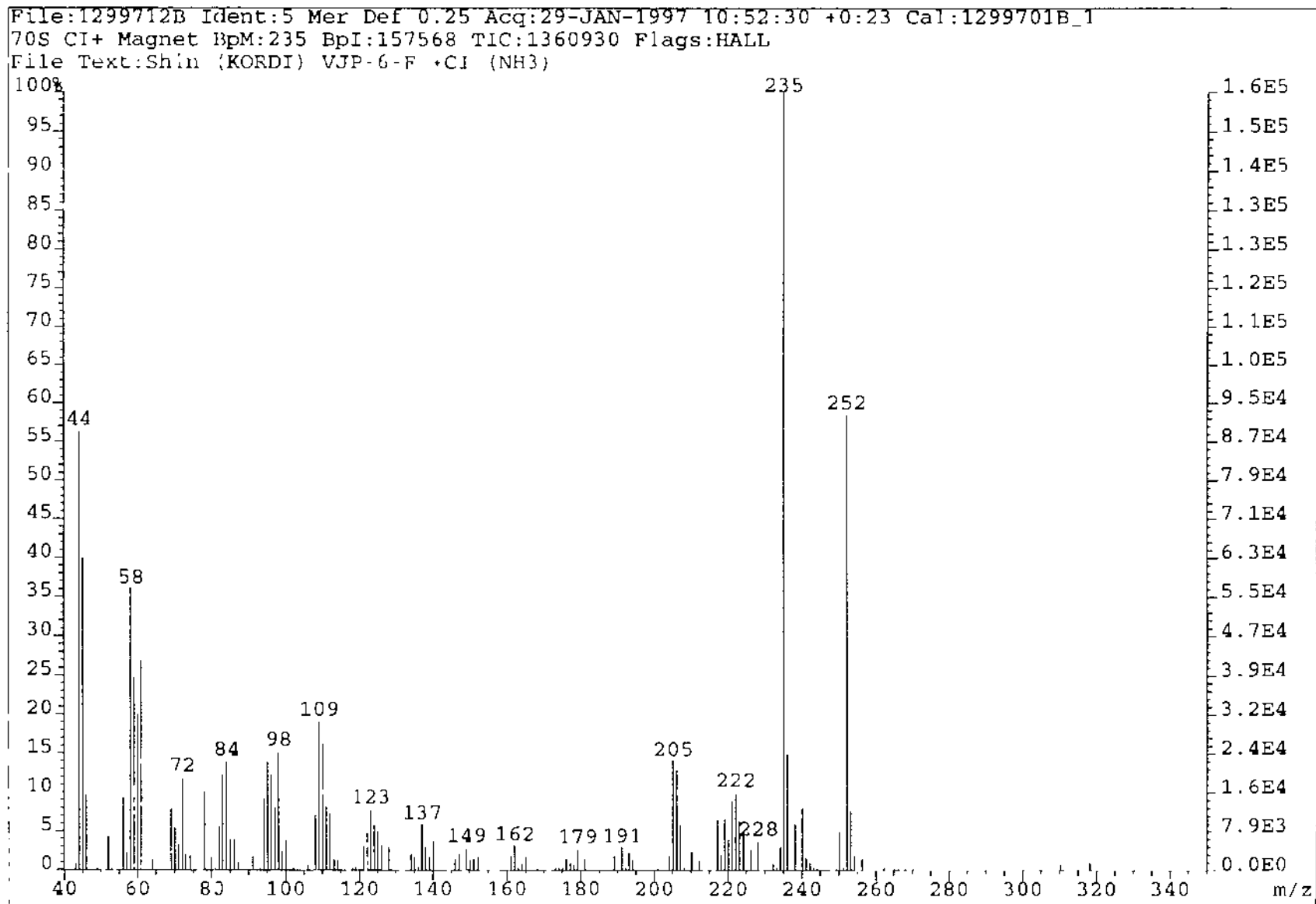


Fig. 3-125. HRMS spectrum of compound VJP-6-B.

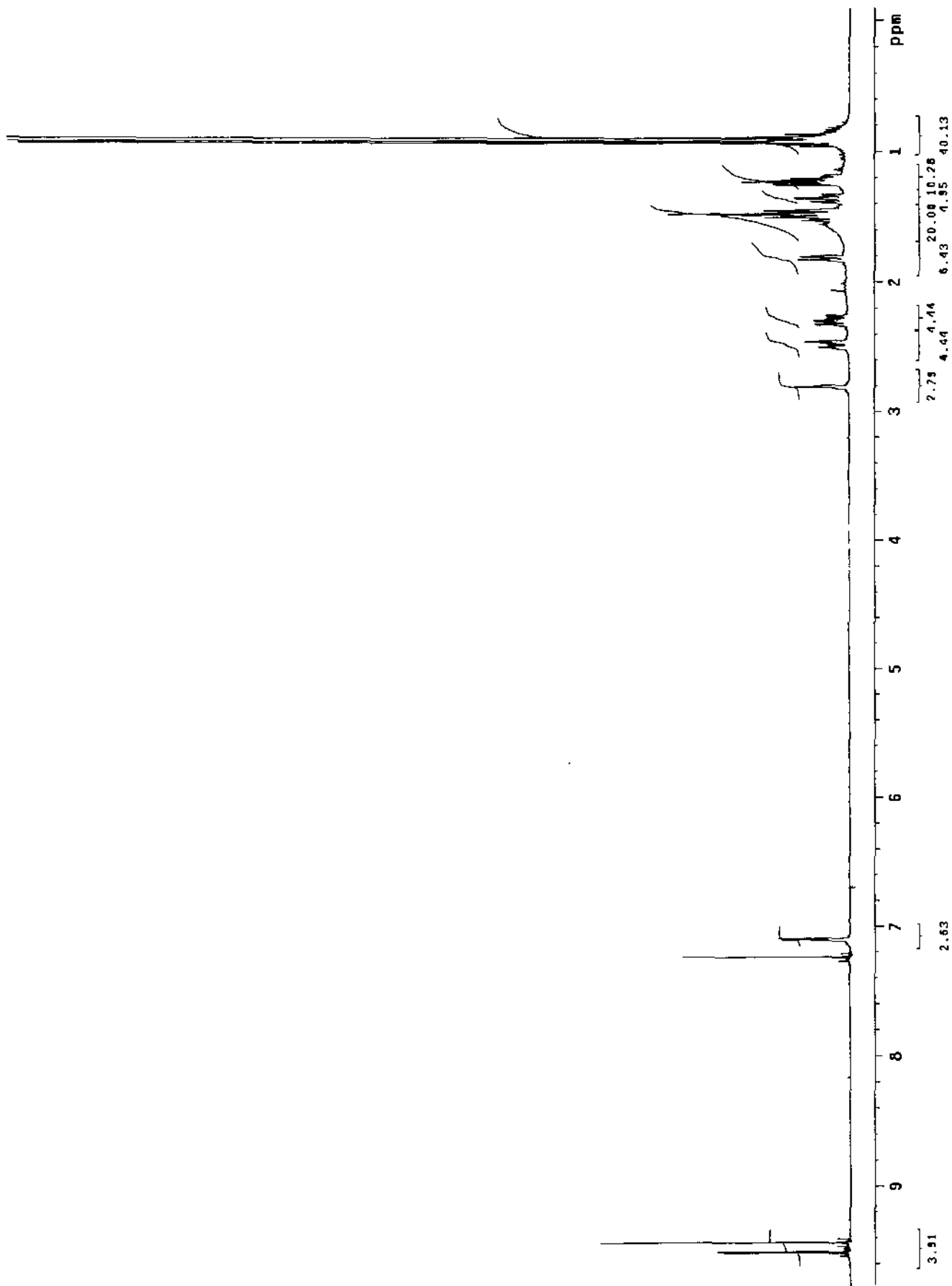


Fig. 3-126. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-B.

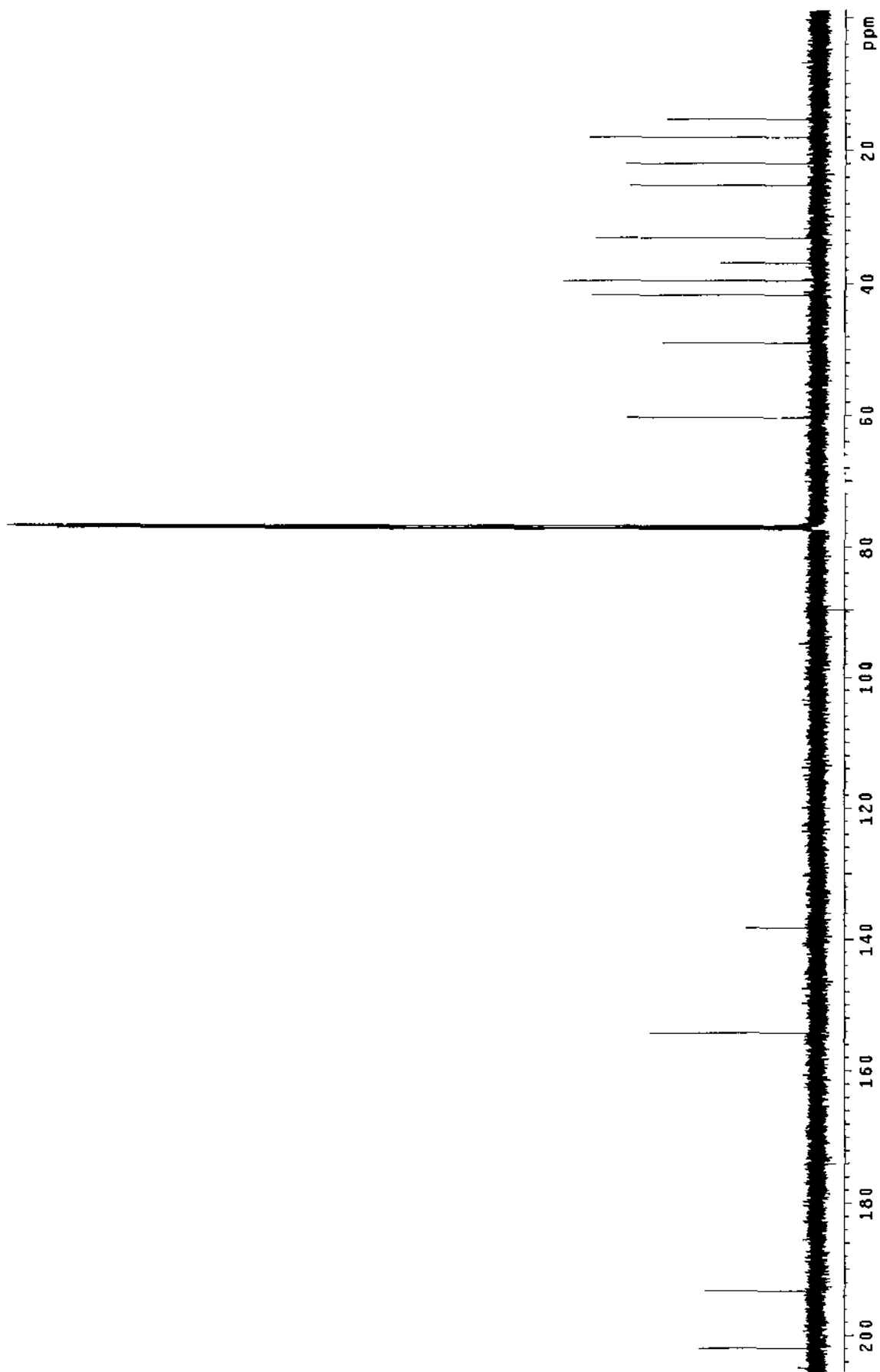


Fig. 3-127. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-B.

Average of 23.003 to 23.026 min. from 12-8703h.d SCALED

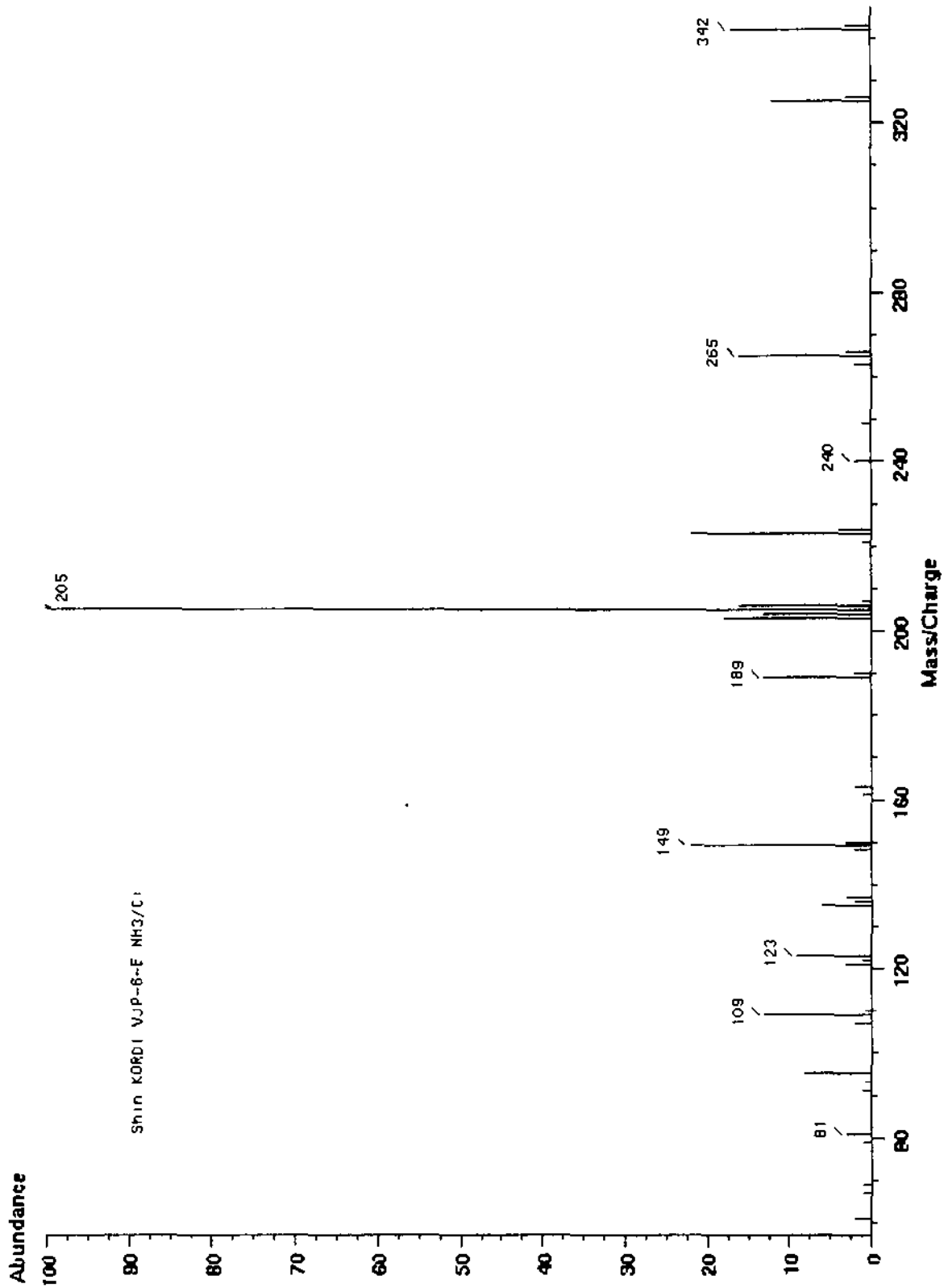


Fig. 3-128. HRMS spectrum of compound VJP-6-C.

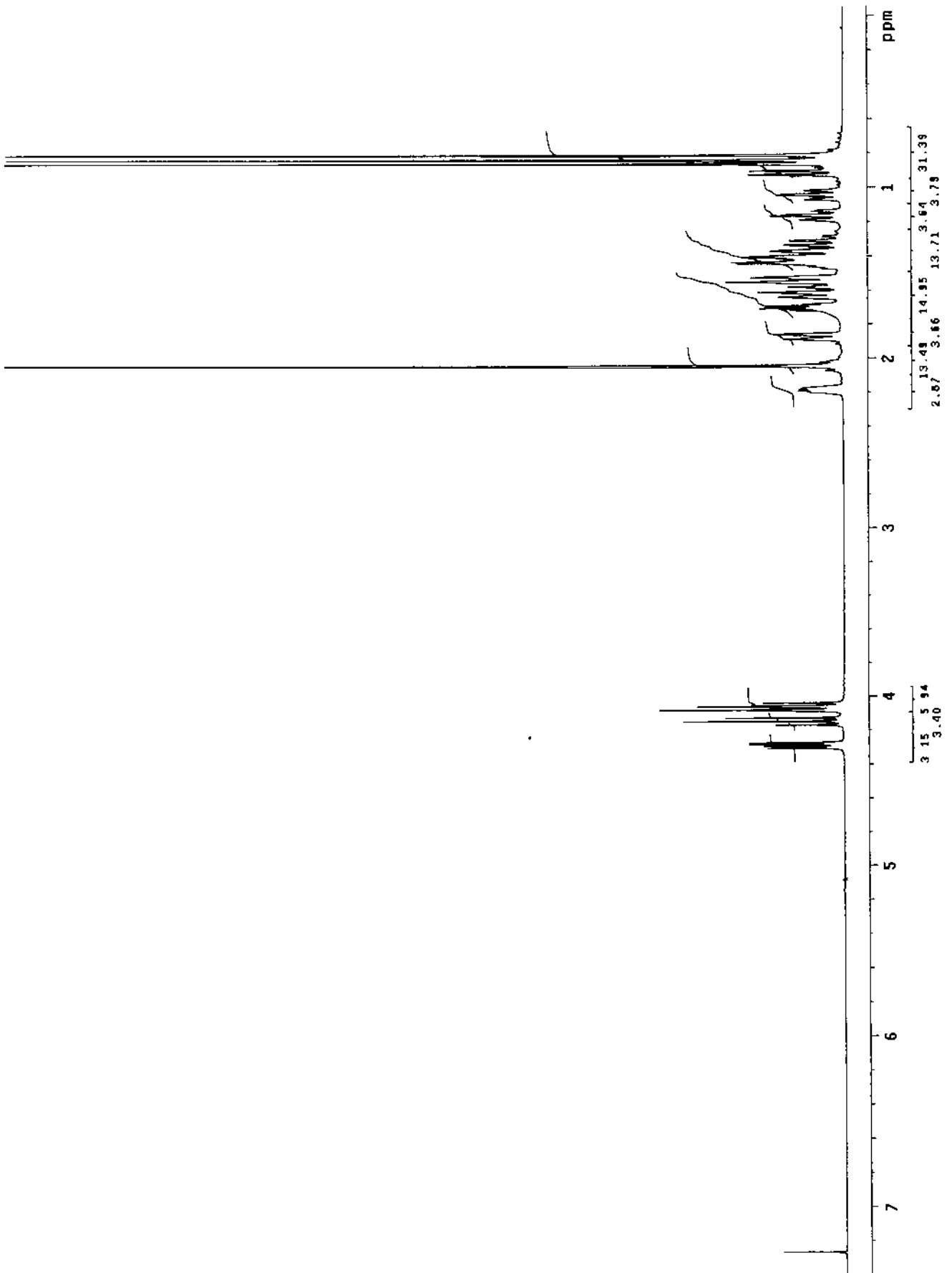


Fig. 3-129. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-C.

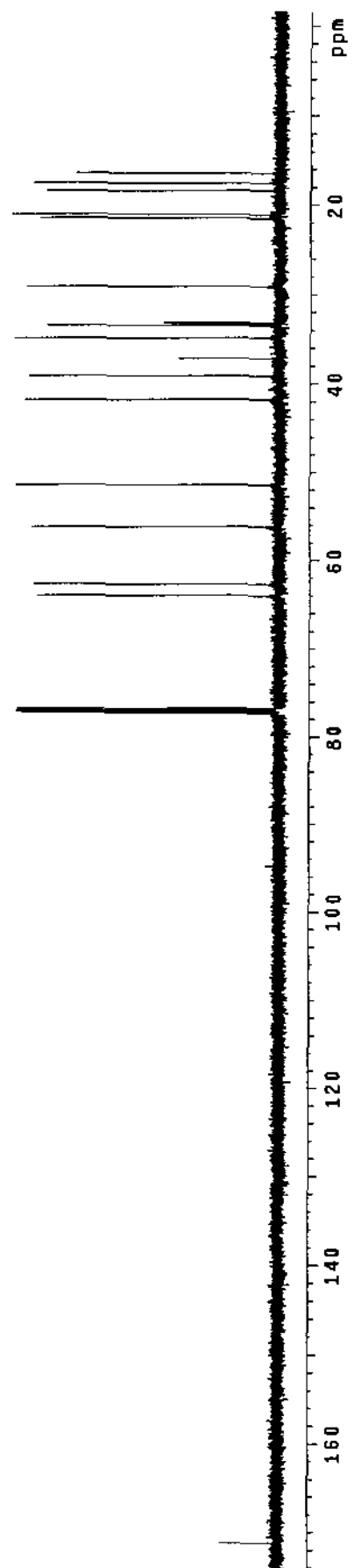


Fig. 3-130. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-C.

File:1299710B Ident:6 Mer Def 0.25 Acq:29-JAN-1997 10:34:35 +0:27 Cal:1299701B_1
70S CI+ Magnet BpM:310 BpI:1430016 TIC:5914416 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) VJP-6-G +CI (NH3)

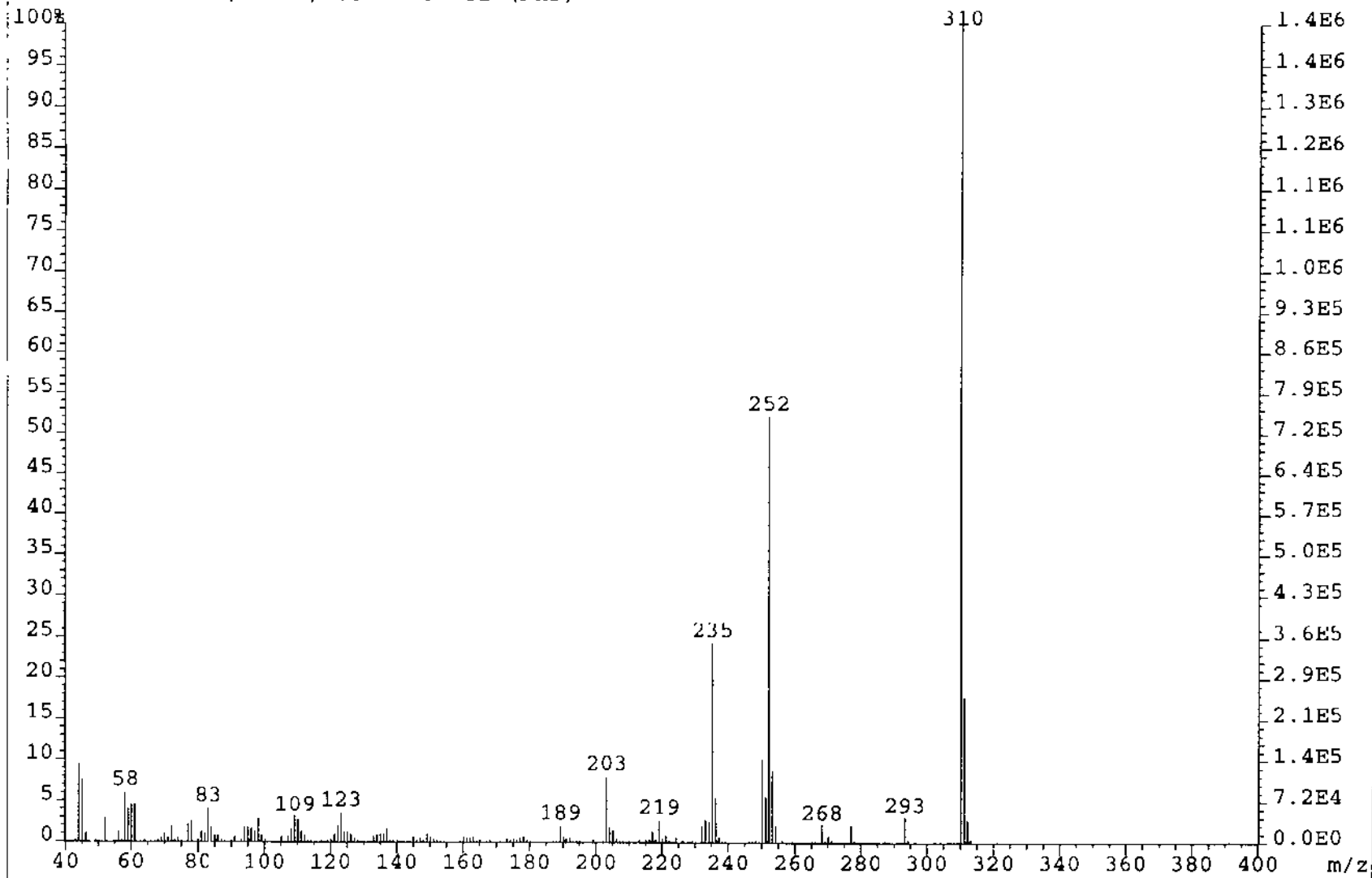


Fig. 3-131. HRMS spectrum of compound VJP-6-D.

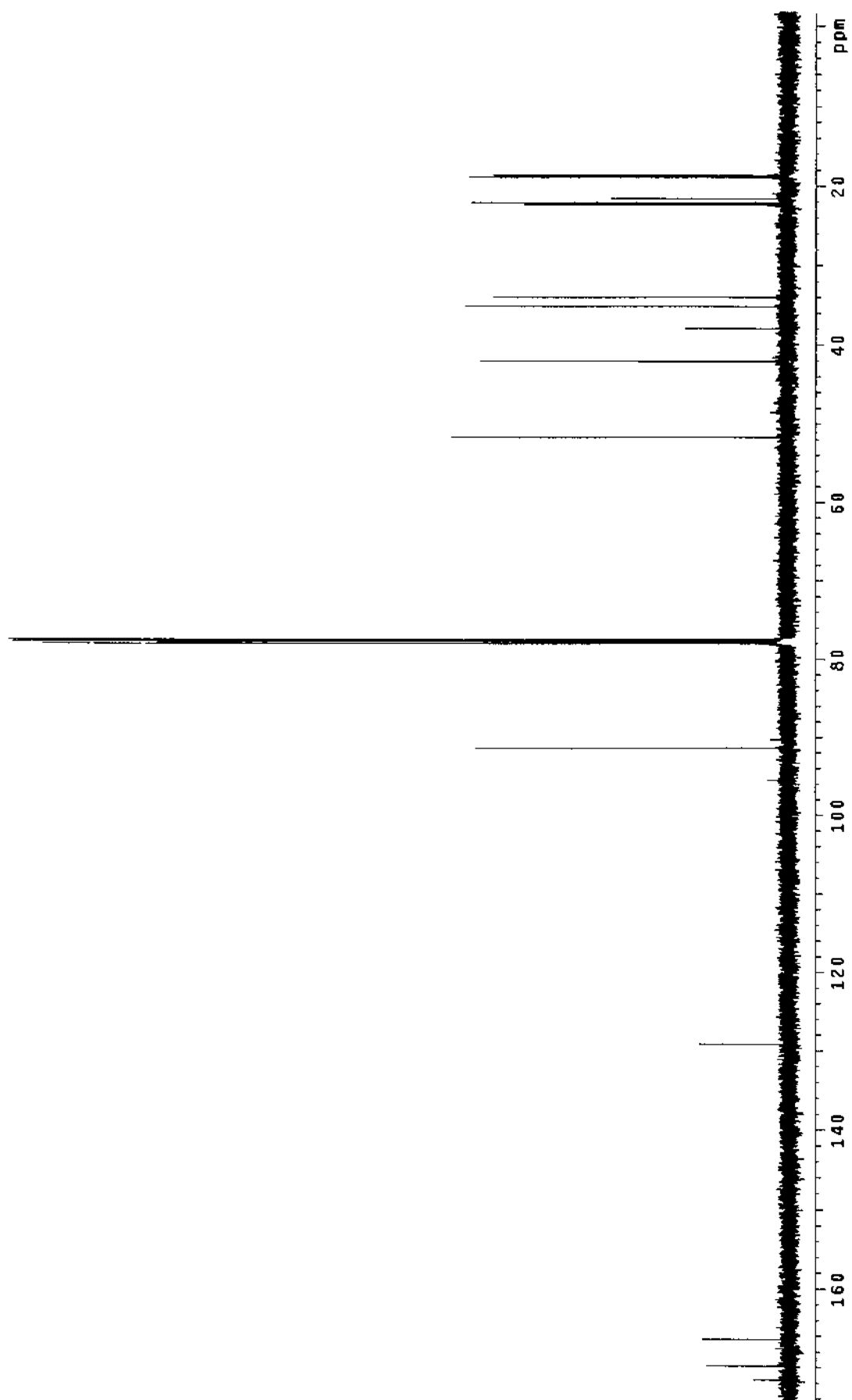


Fig. 3-132. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-D.

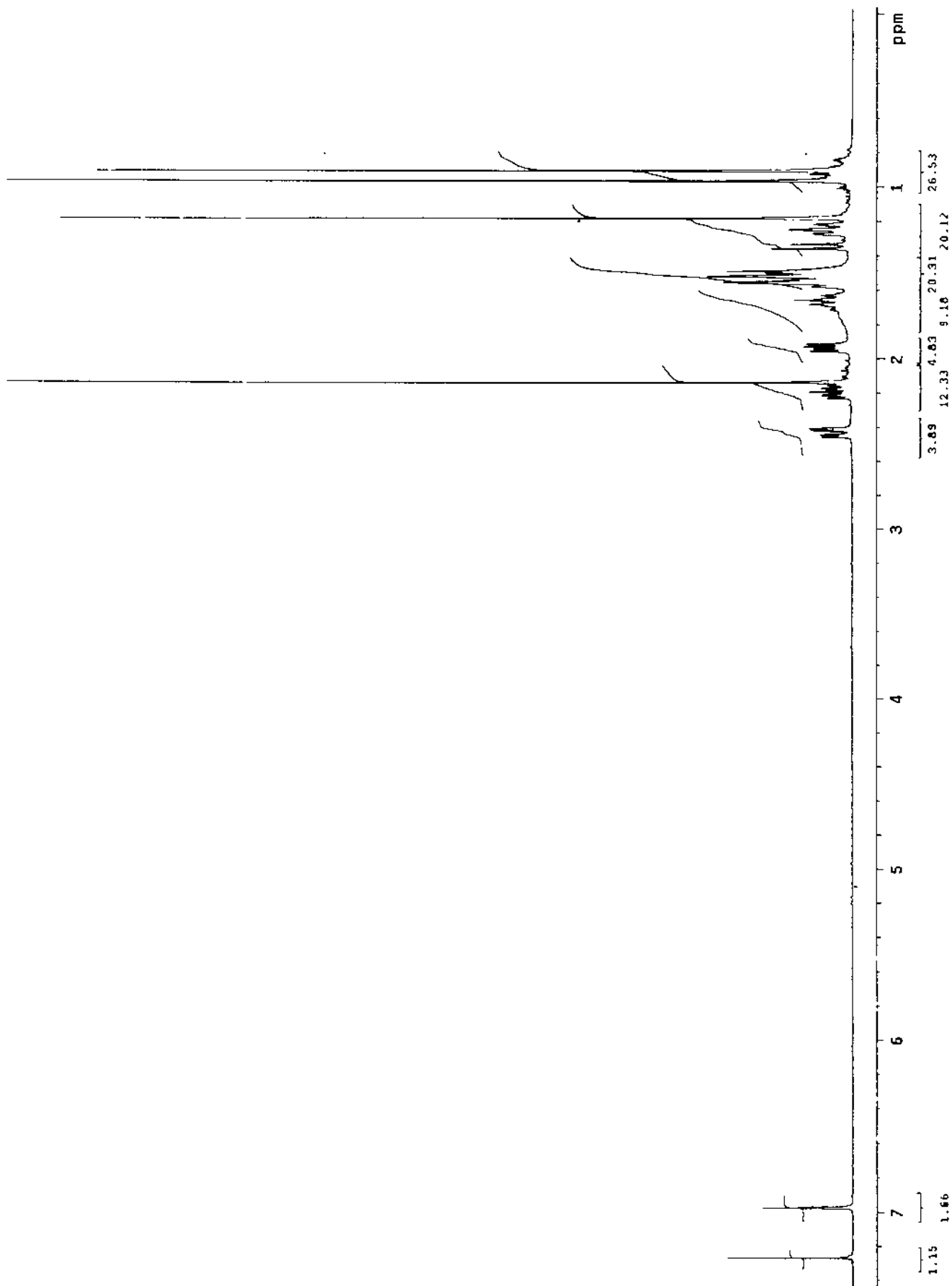


Fig. 3-133. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-D.

Average of 23.741 to 23.804 min. from 12-09702h.d SCALED

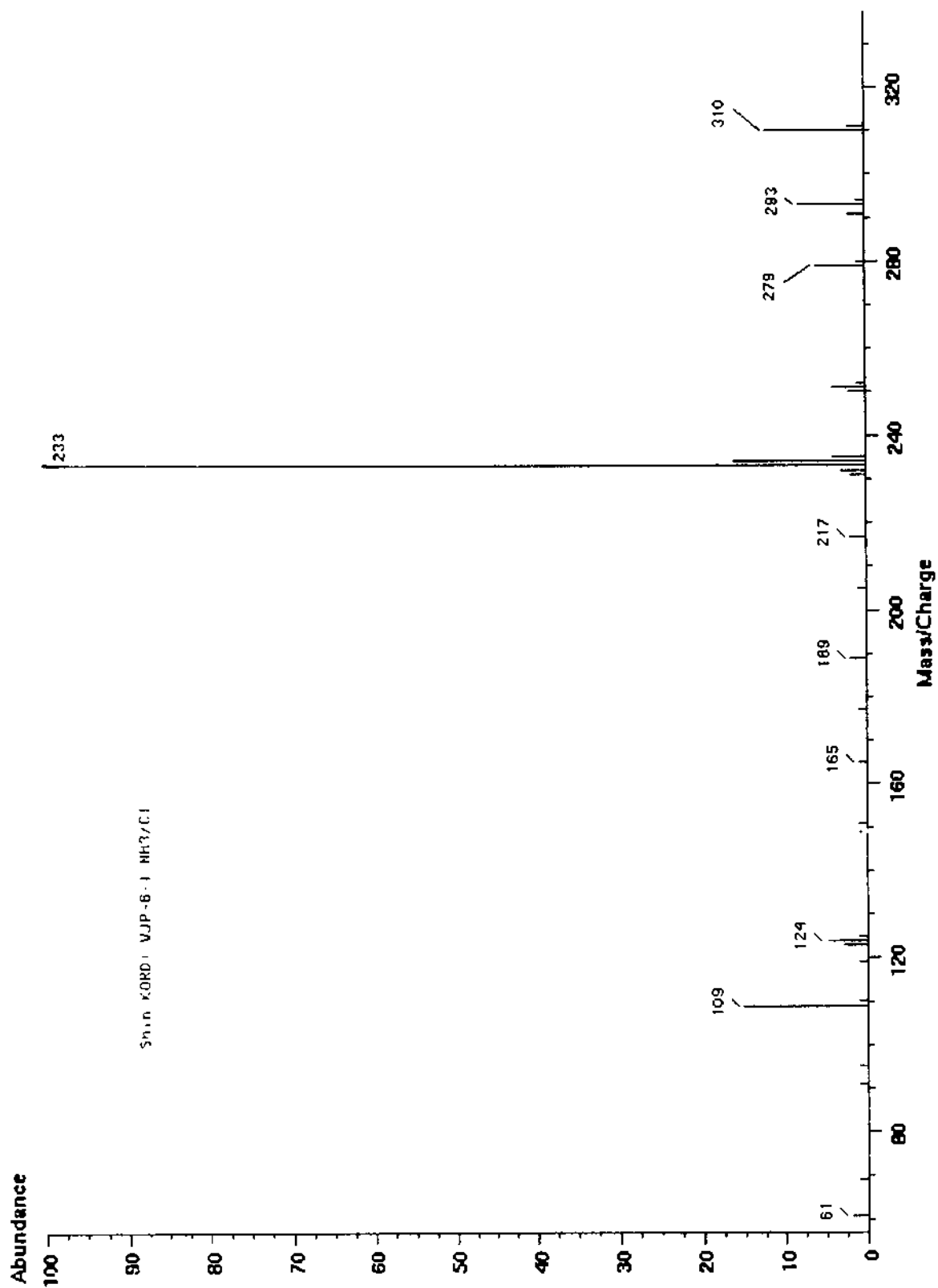


Fig. 3-134. HRMS spectrum of compound VJP-6-E.

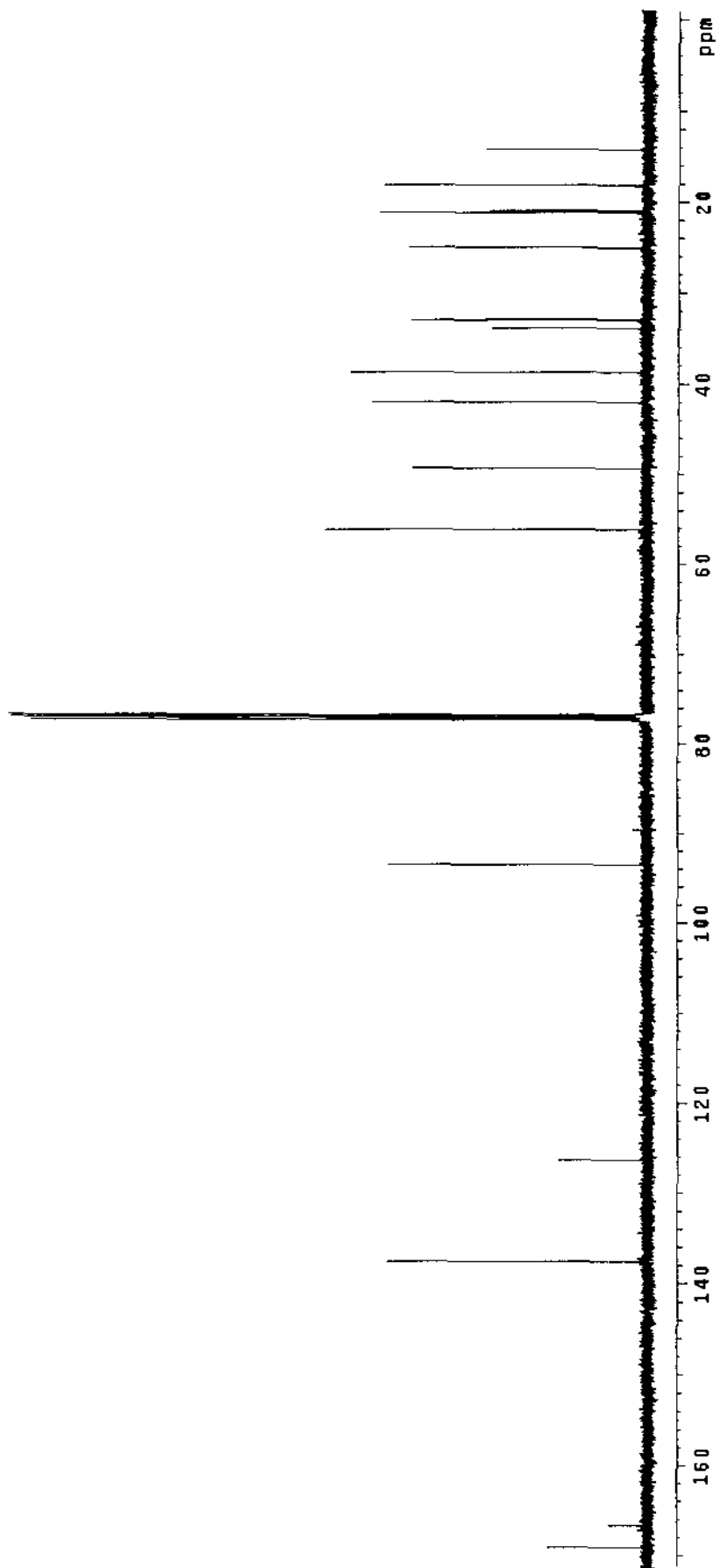


Fig. 3-135. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-E.

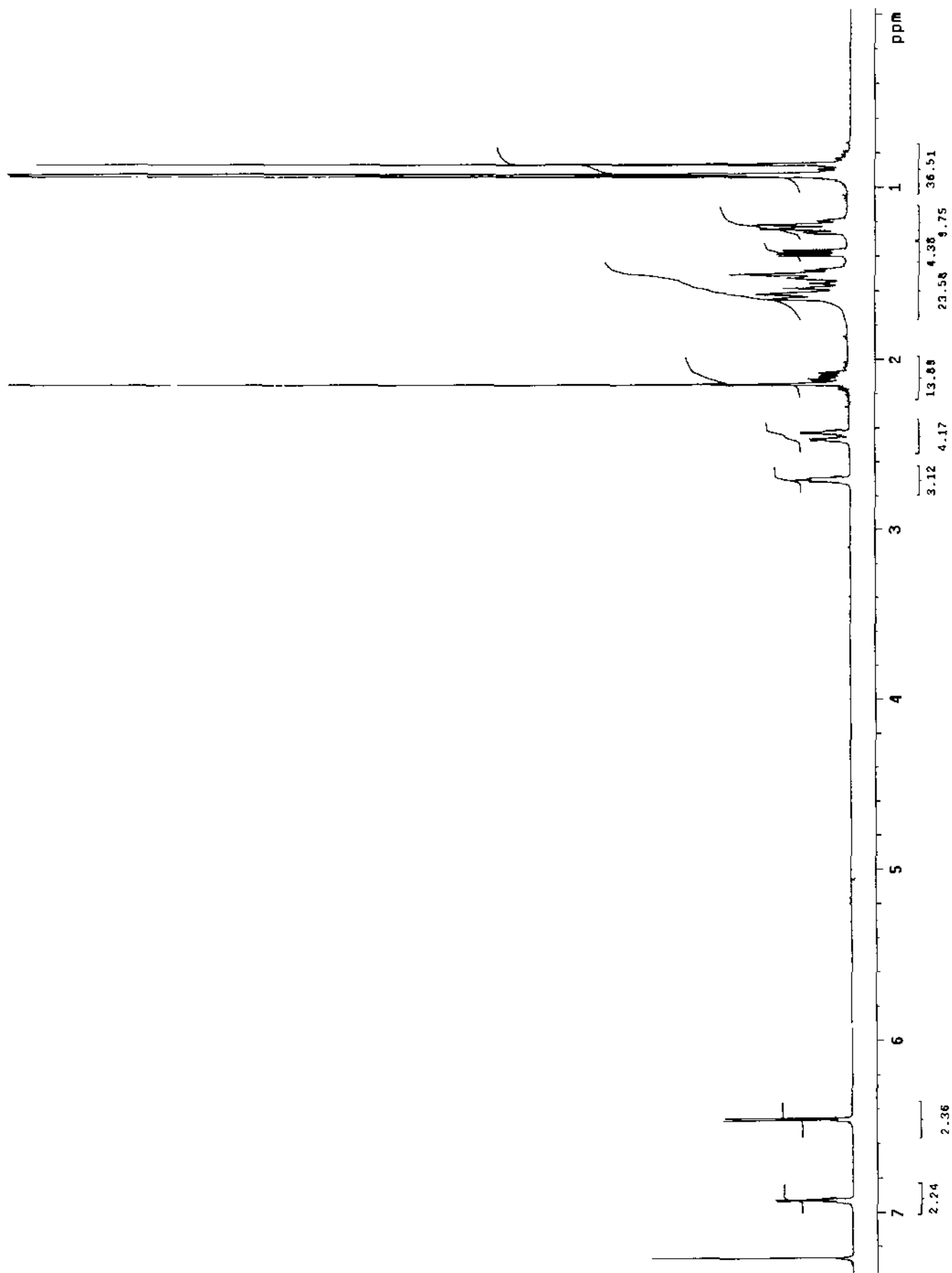


Fig. 3-136. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-E.

Scan 956 (20.499 min.) of 11189605h.d SCALED

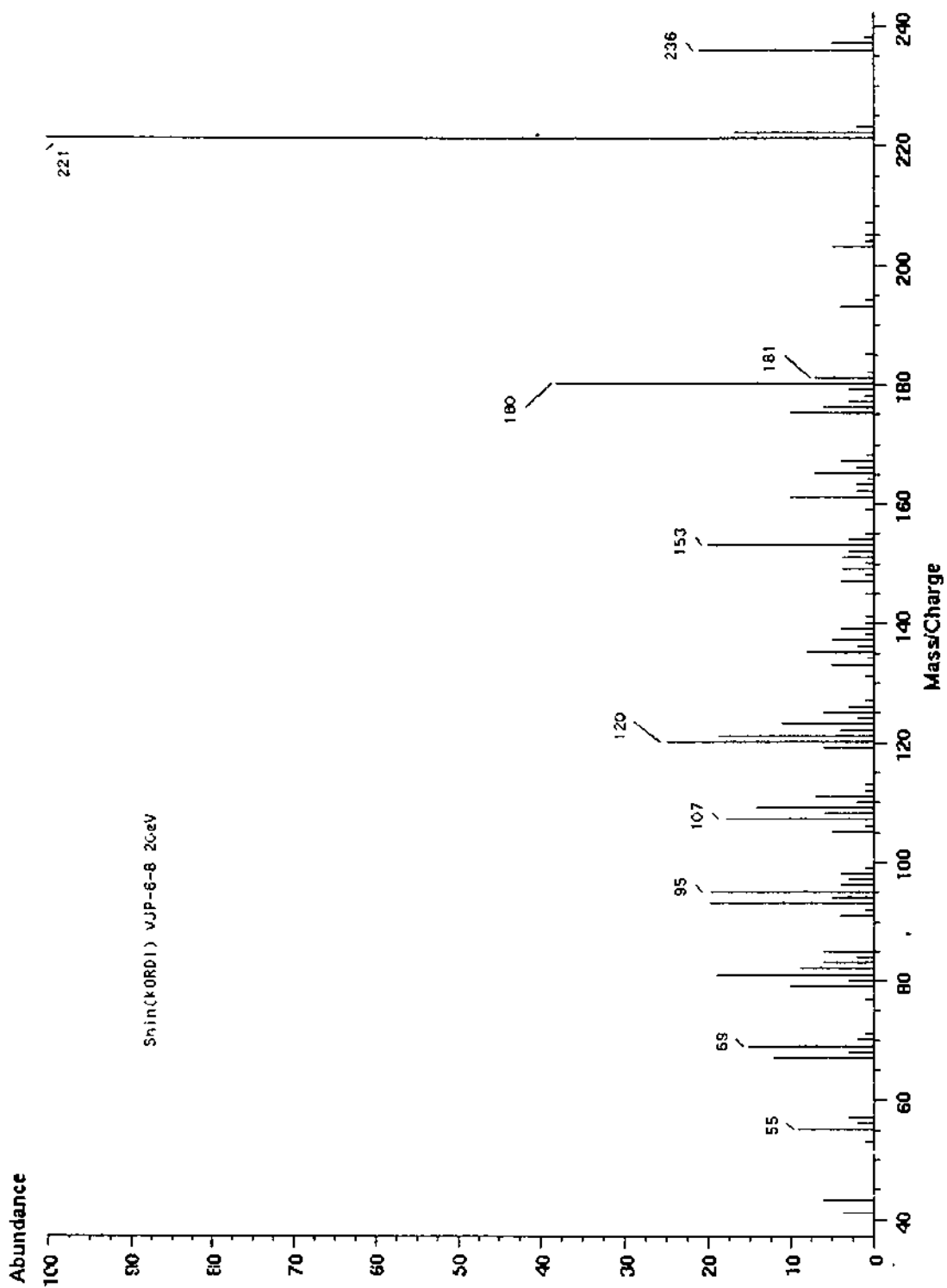


Fig. 3-137. HRMS spectrum of compound VJP-6-F.

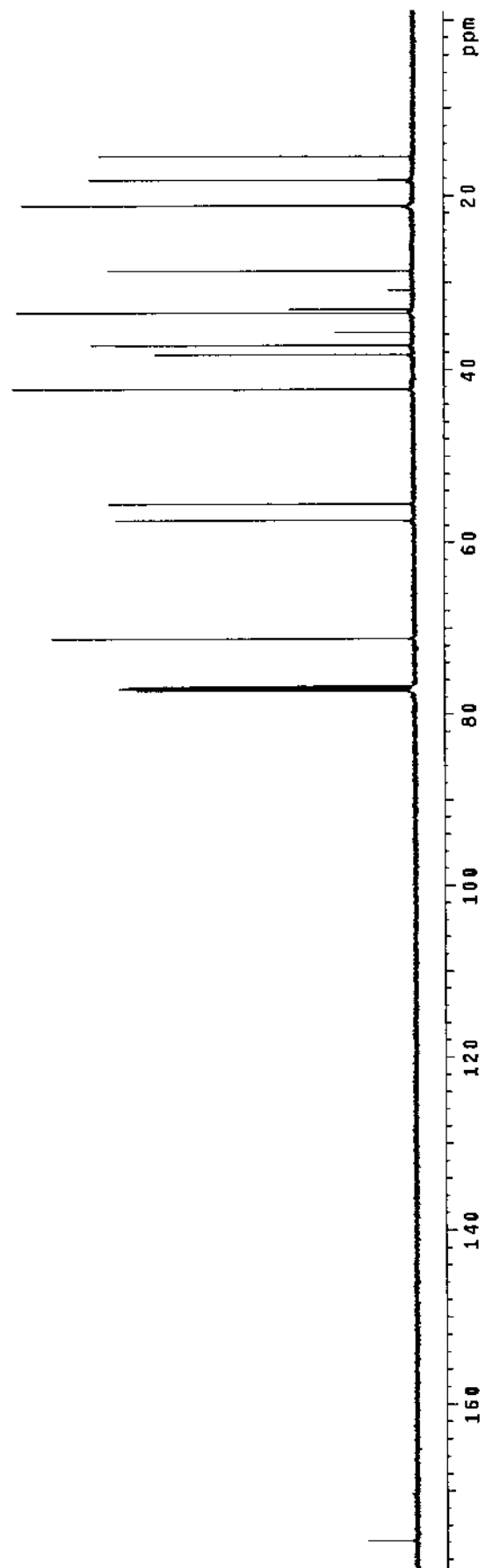


Fig. 3-138. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-F.

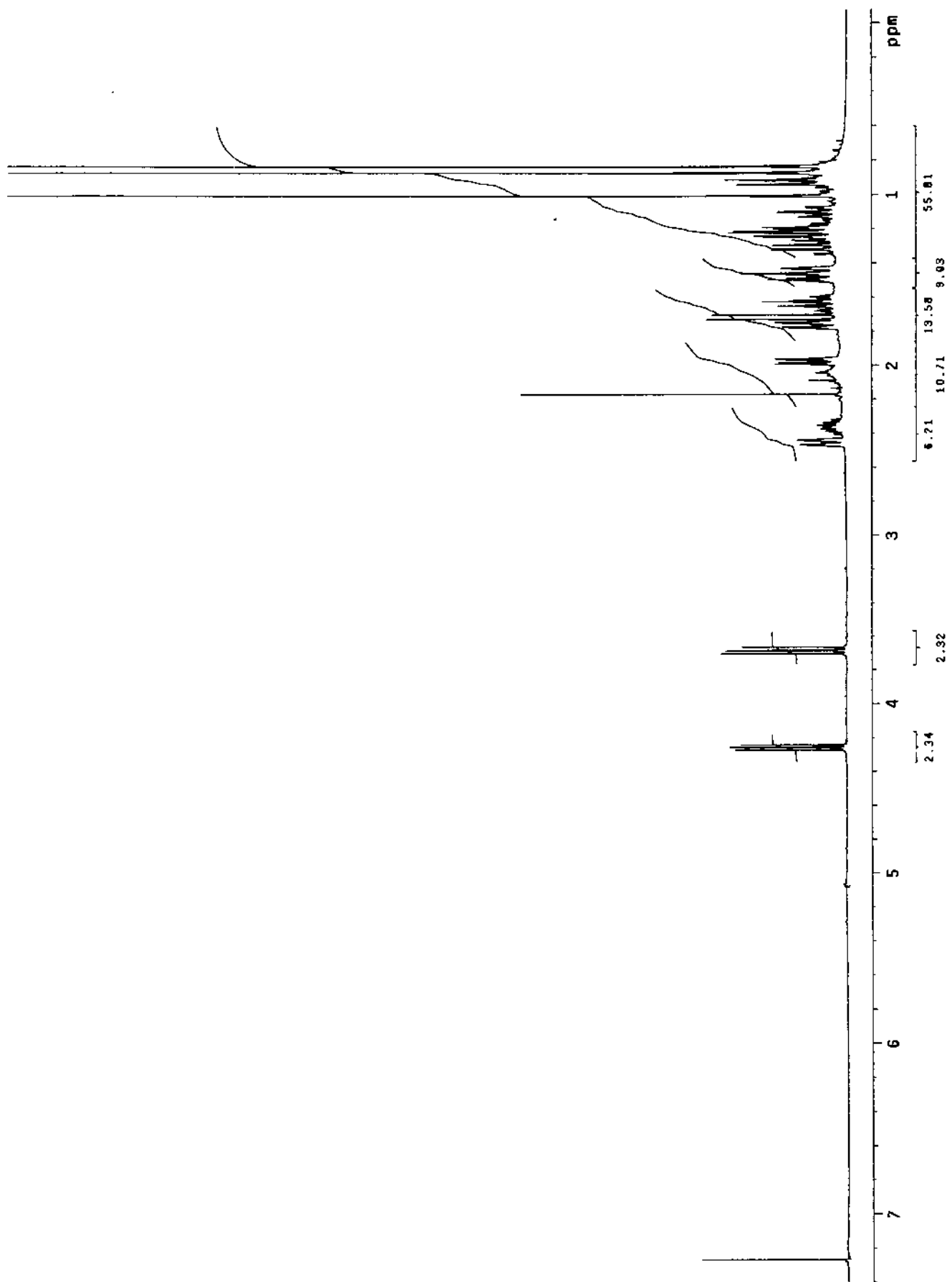


Fig. 3-139. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-F.

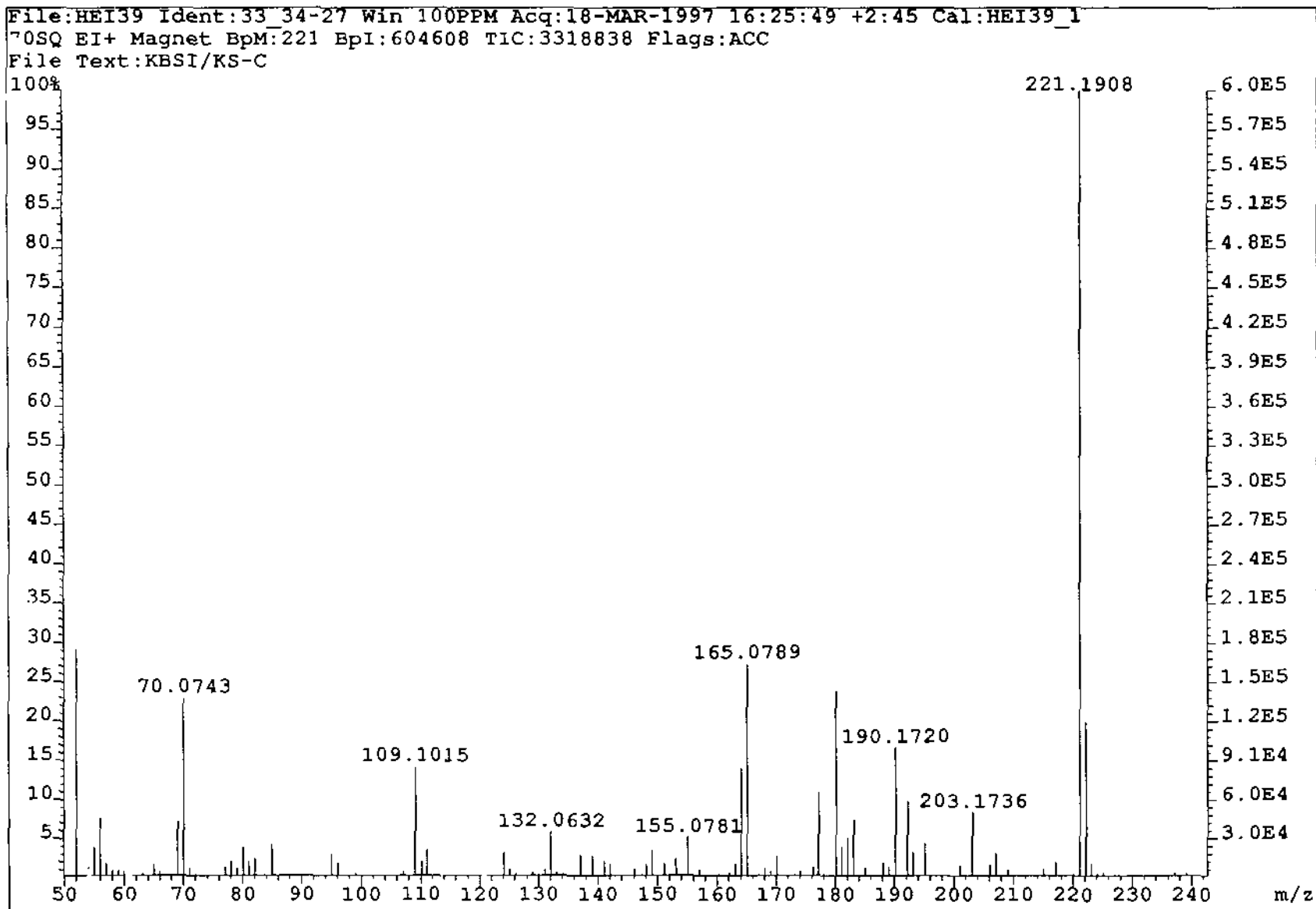


Fig. 3-140. HRMS spectrum of compound VJP-6-G.

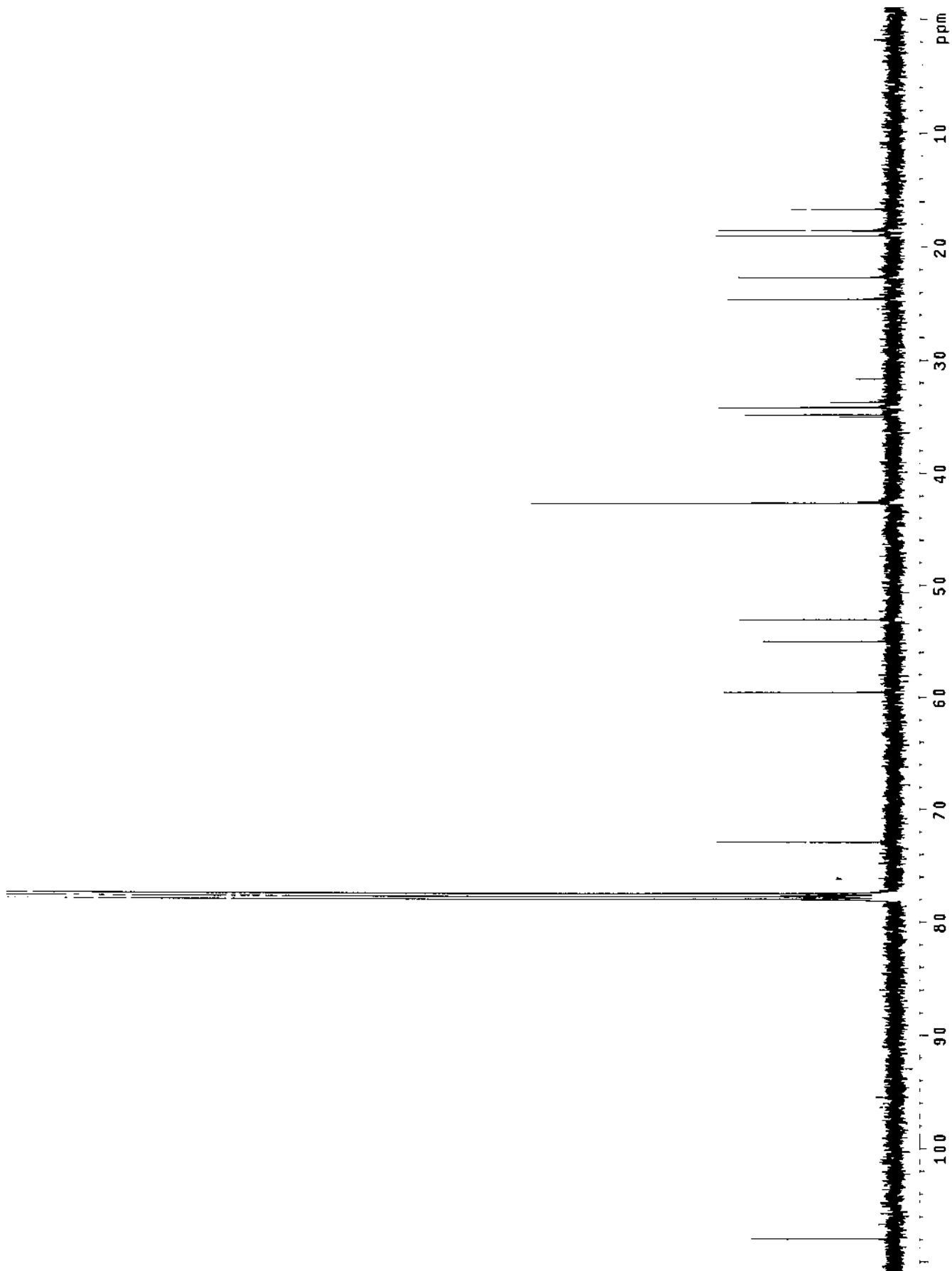


Fig. 3-141. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-G.

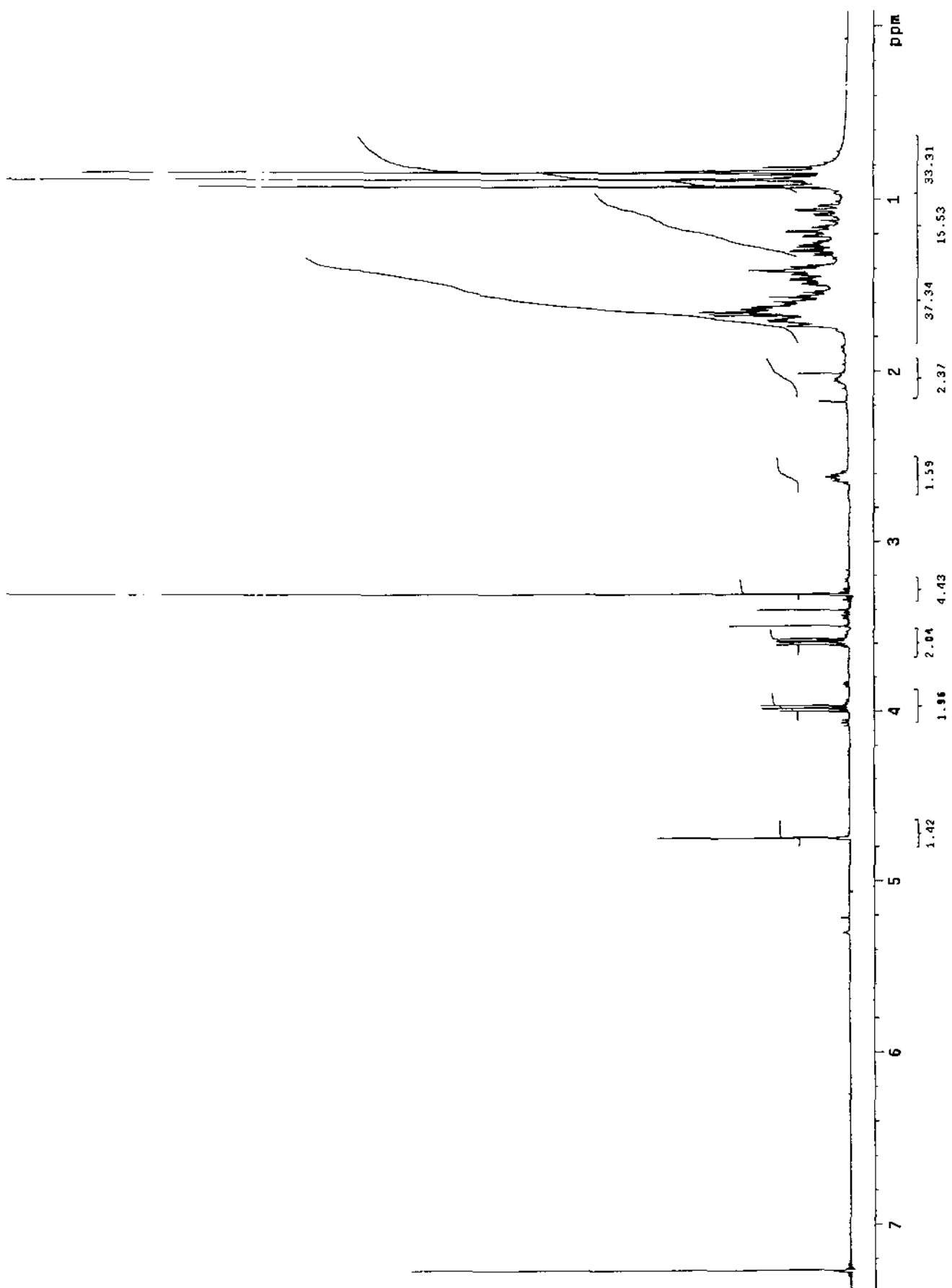


Fig. 3-142. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-G.

File:11219606B Ident:17 Mer Def 0.25 Acq:21-NOV-1996 10:58:41 +1:36 Cal:11219601B_1
70S CI+ Magnet BpM:235 BpI:10177727 TIC:65464328 Flags:HALL
File Text:Shin (KORDI) VJP-6-D DCT (NH3)

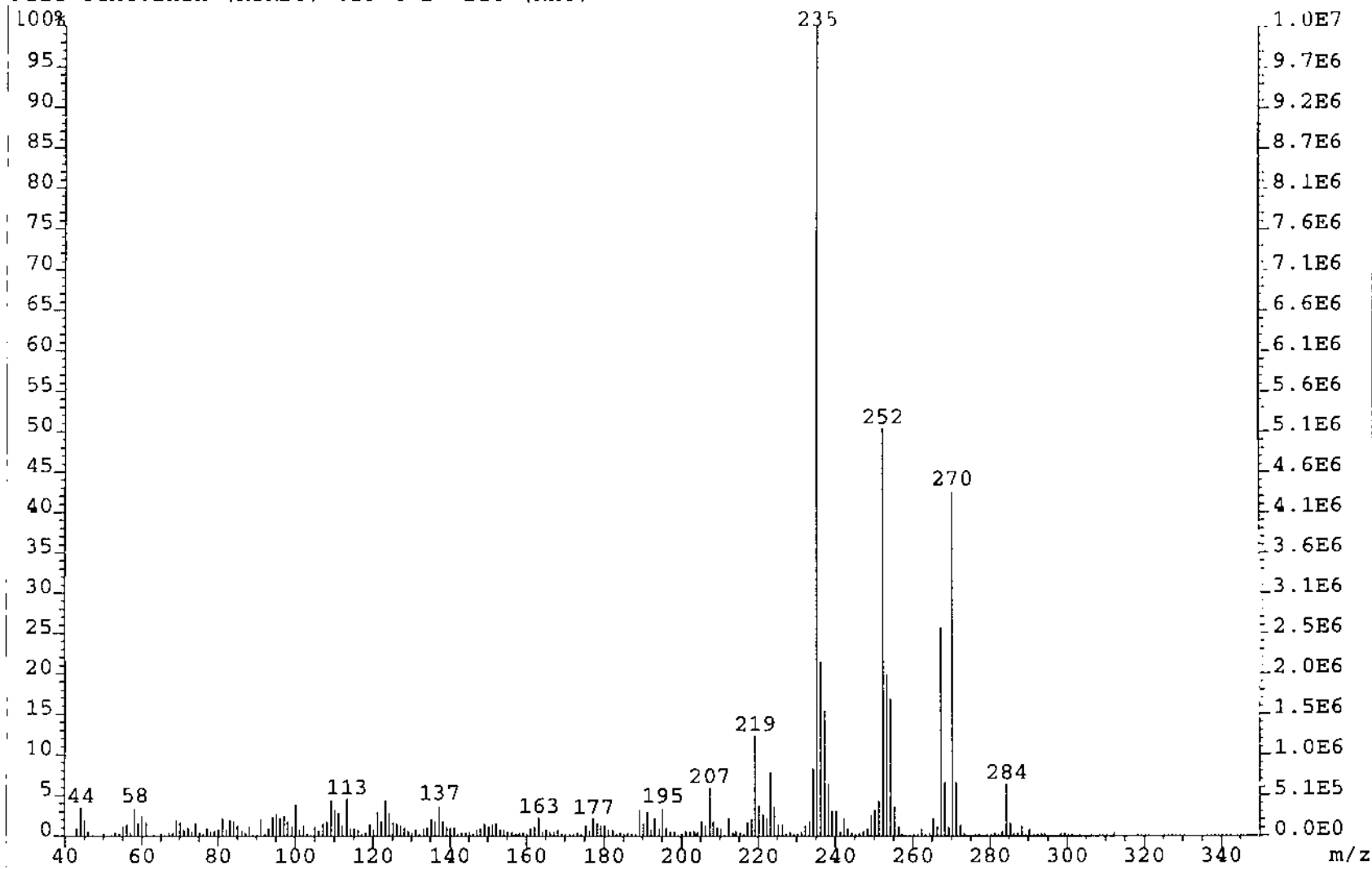


Fig. 3-143. HRMS spectrum of compound VJP-6-H.

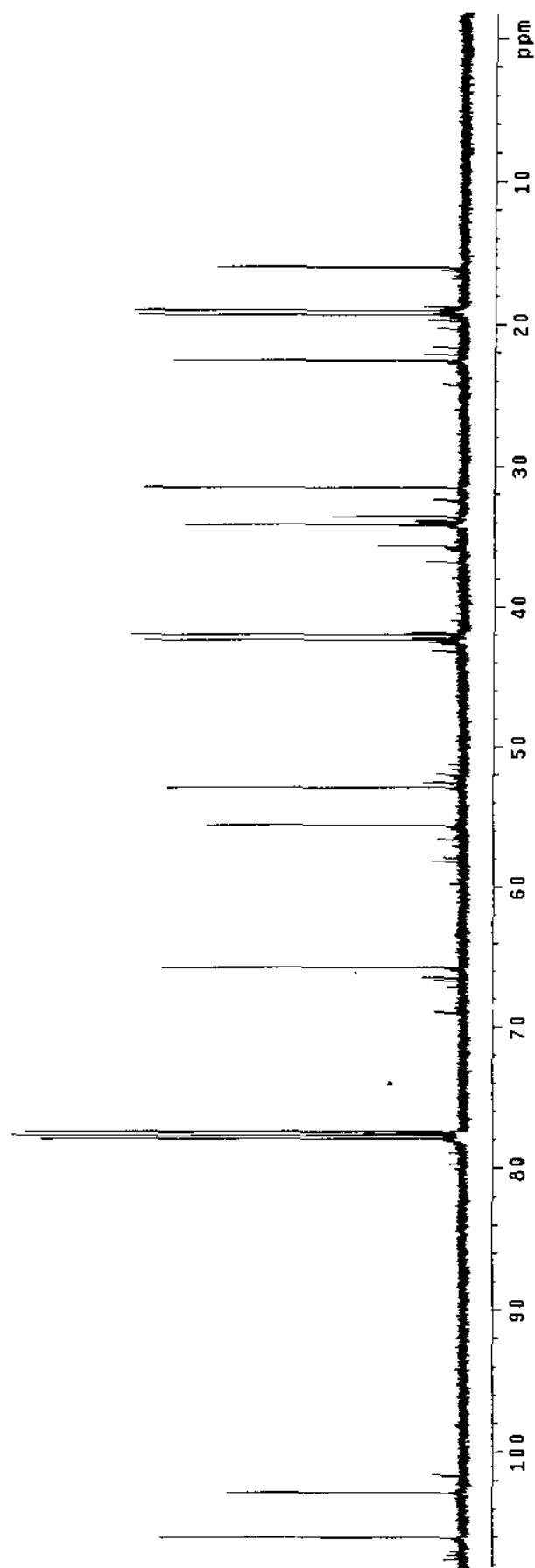


Fig. 3-144. Carbon NMR spectrum of compound **VJP-6-H**.

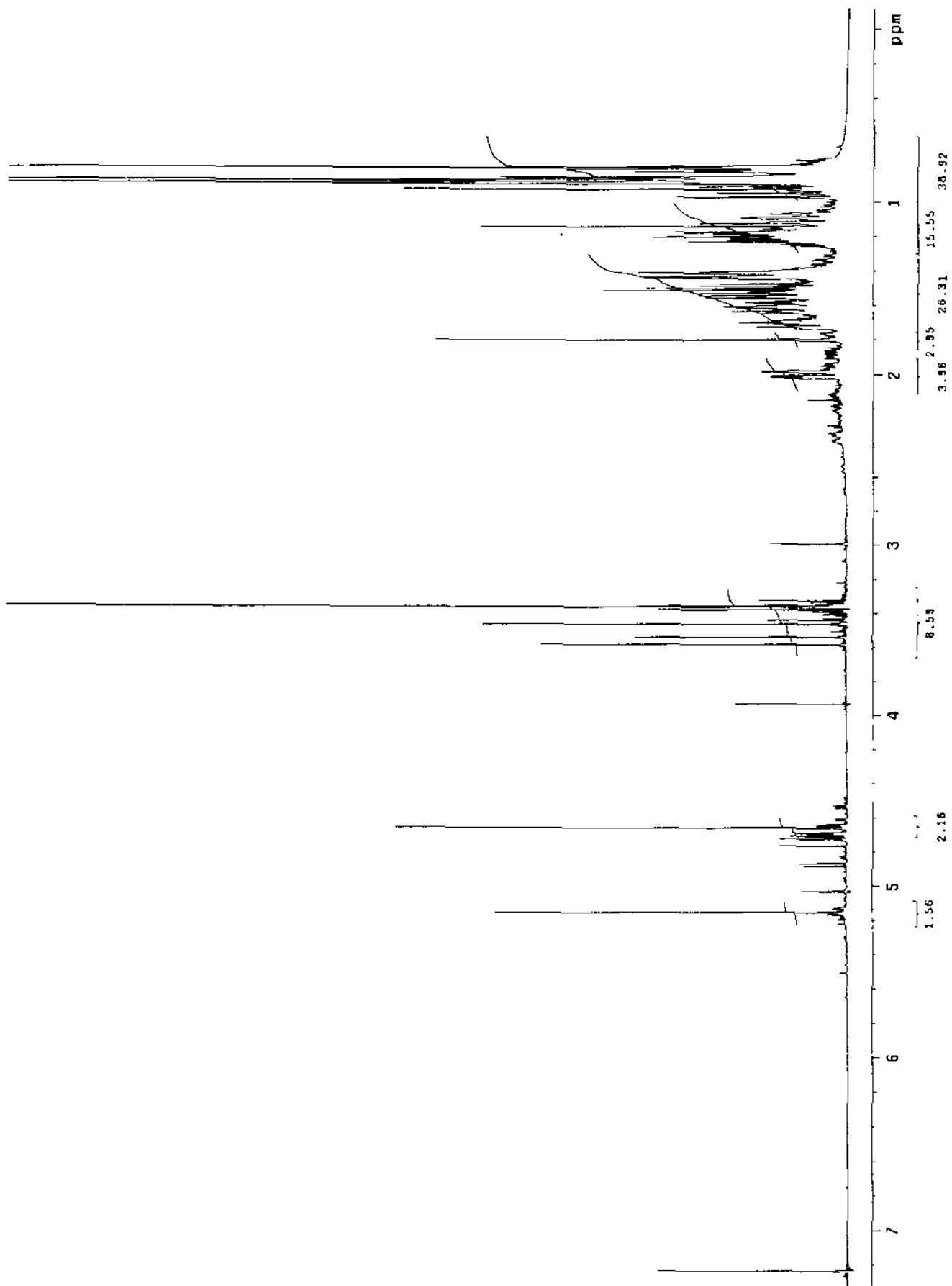


Fig. 3-145. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-H.

Scan 833 (18.254 min) of 11169607h.d SCALED

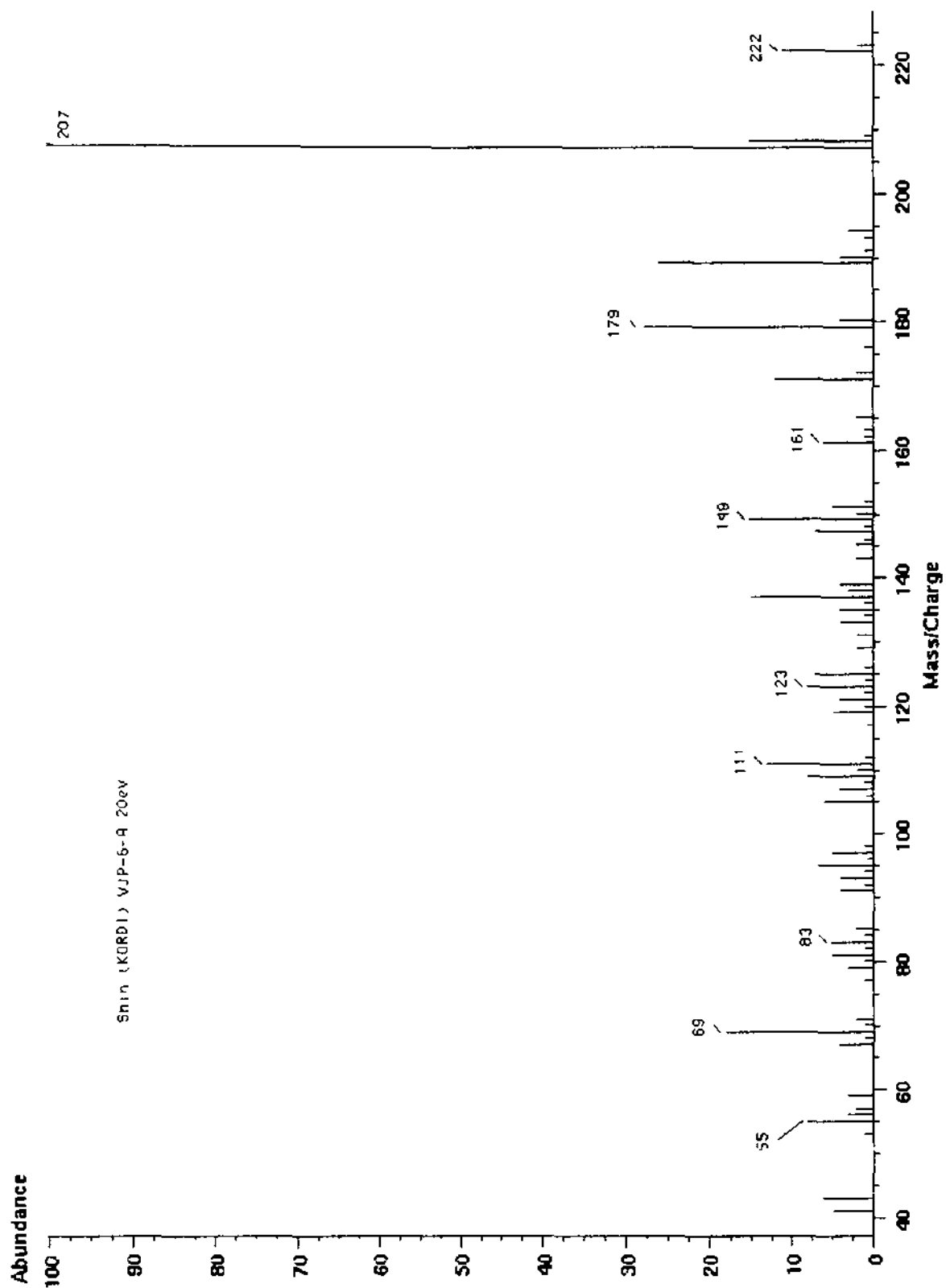


Fig. 3-146. HRMS spectrum of compound VJP-6-1.

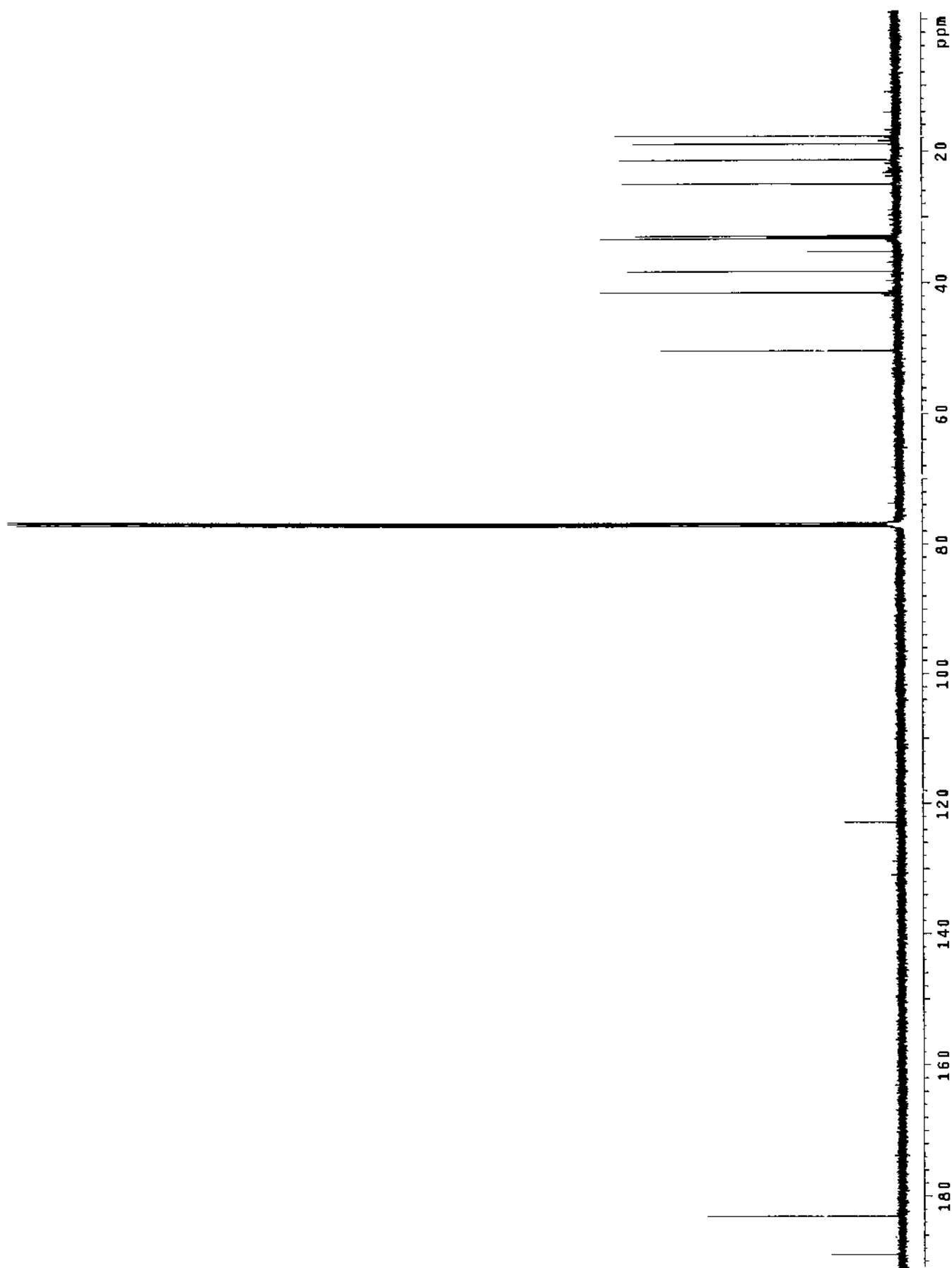


Fig. 3-147. Carbon NMR spectrum of compound **VJP-6-1**.

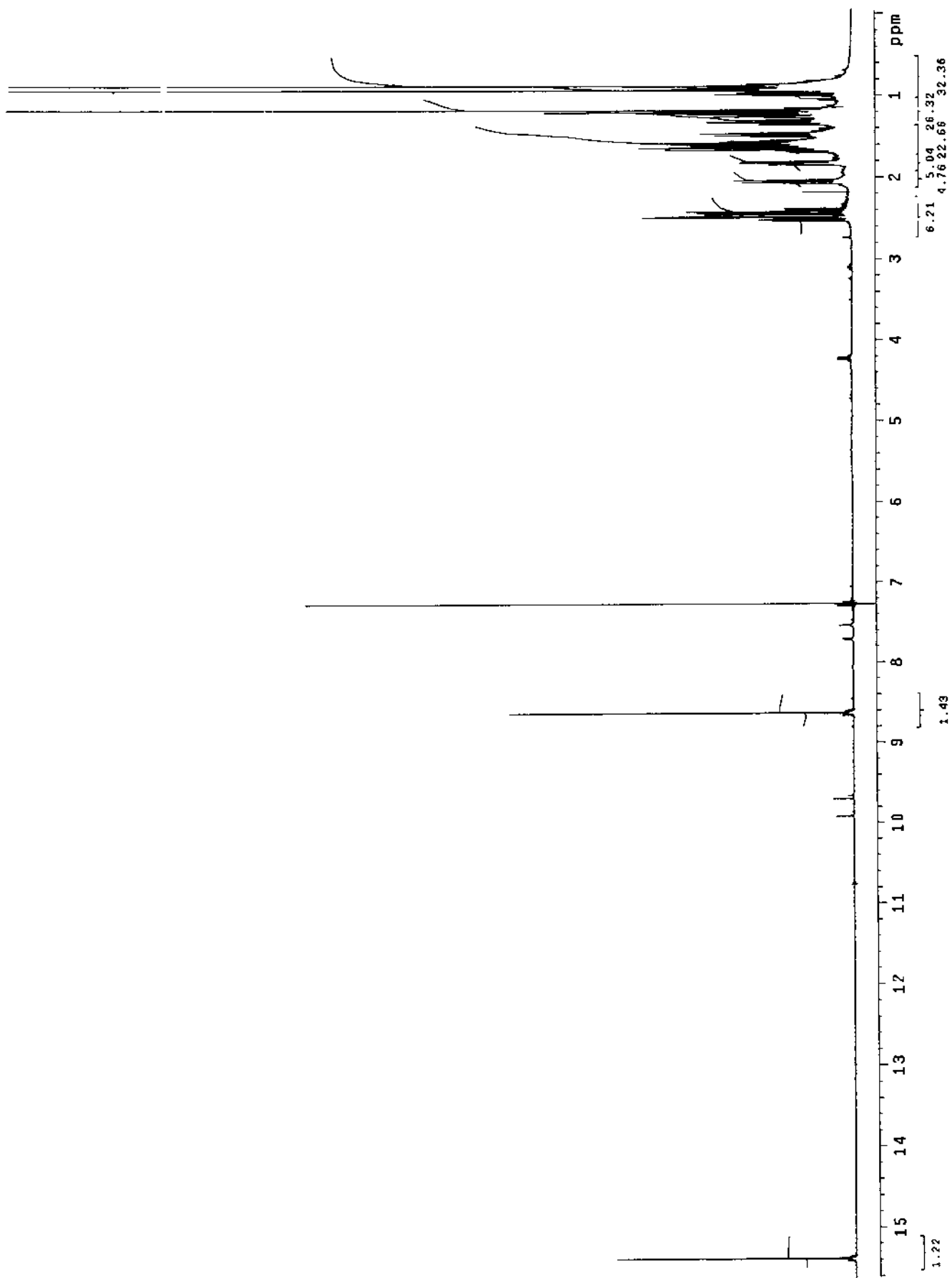


Fig. 3-148. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-1.

Average of 21.175 to 21.225 min. from 1249701h.d SCALED

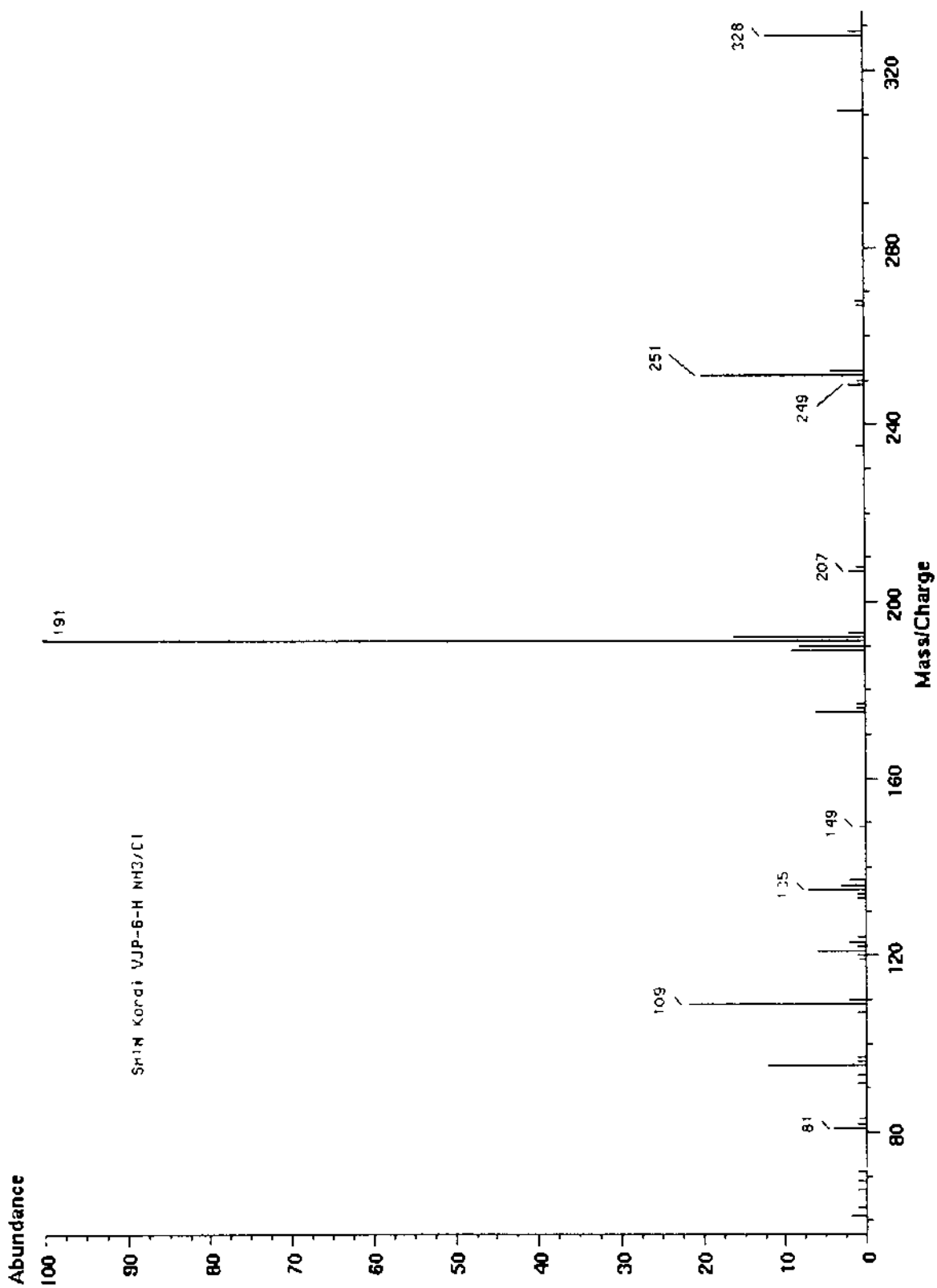


Fig. 3-149. HRMS spectrum of compound VJP-6-J.

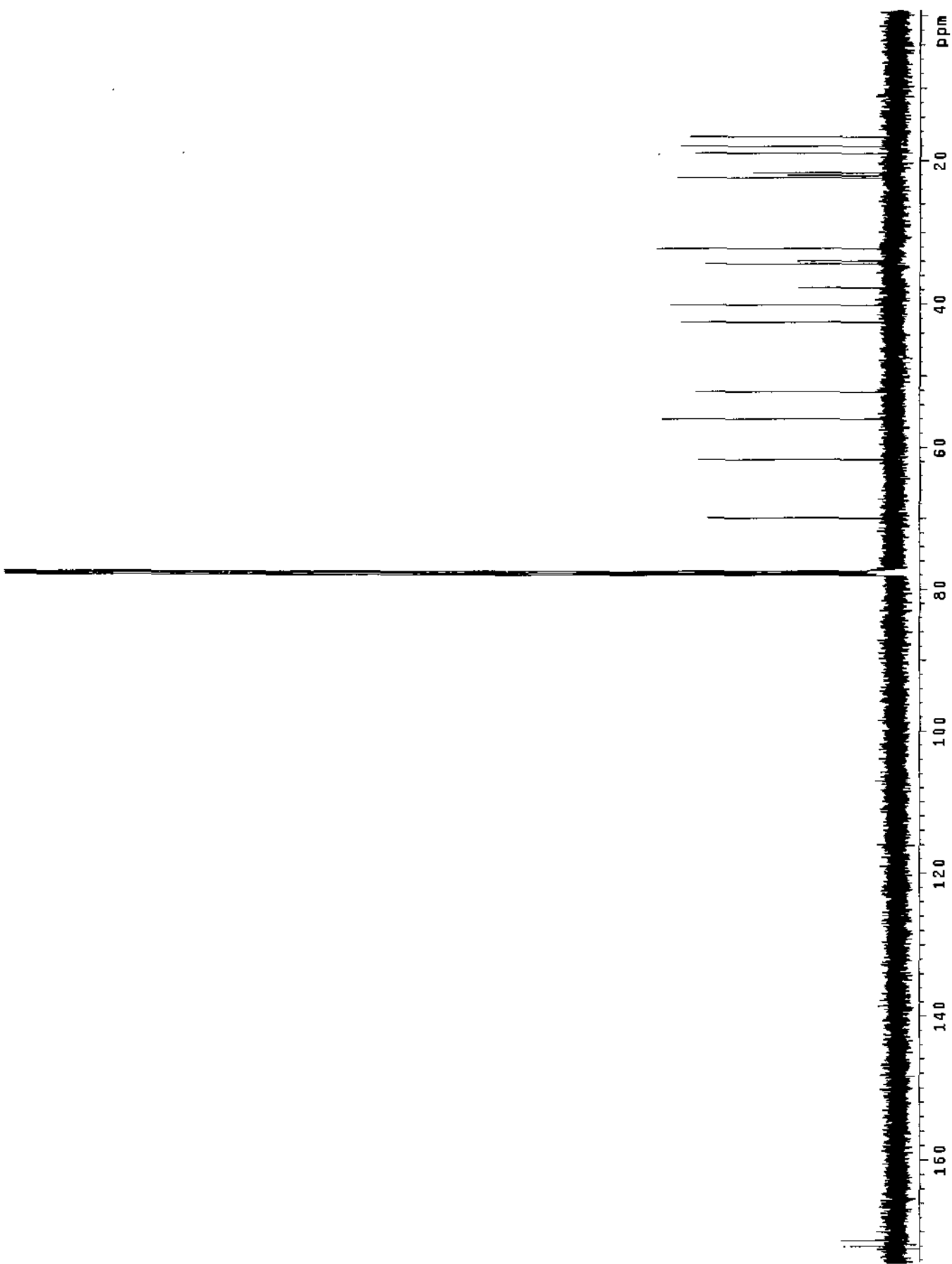


Fig. 3-150. Carbon NMR spectrum of compound VJP-6-J.

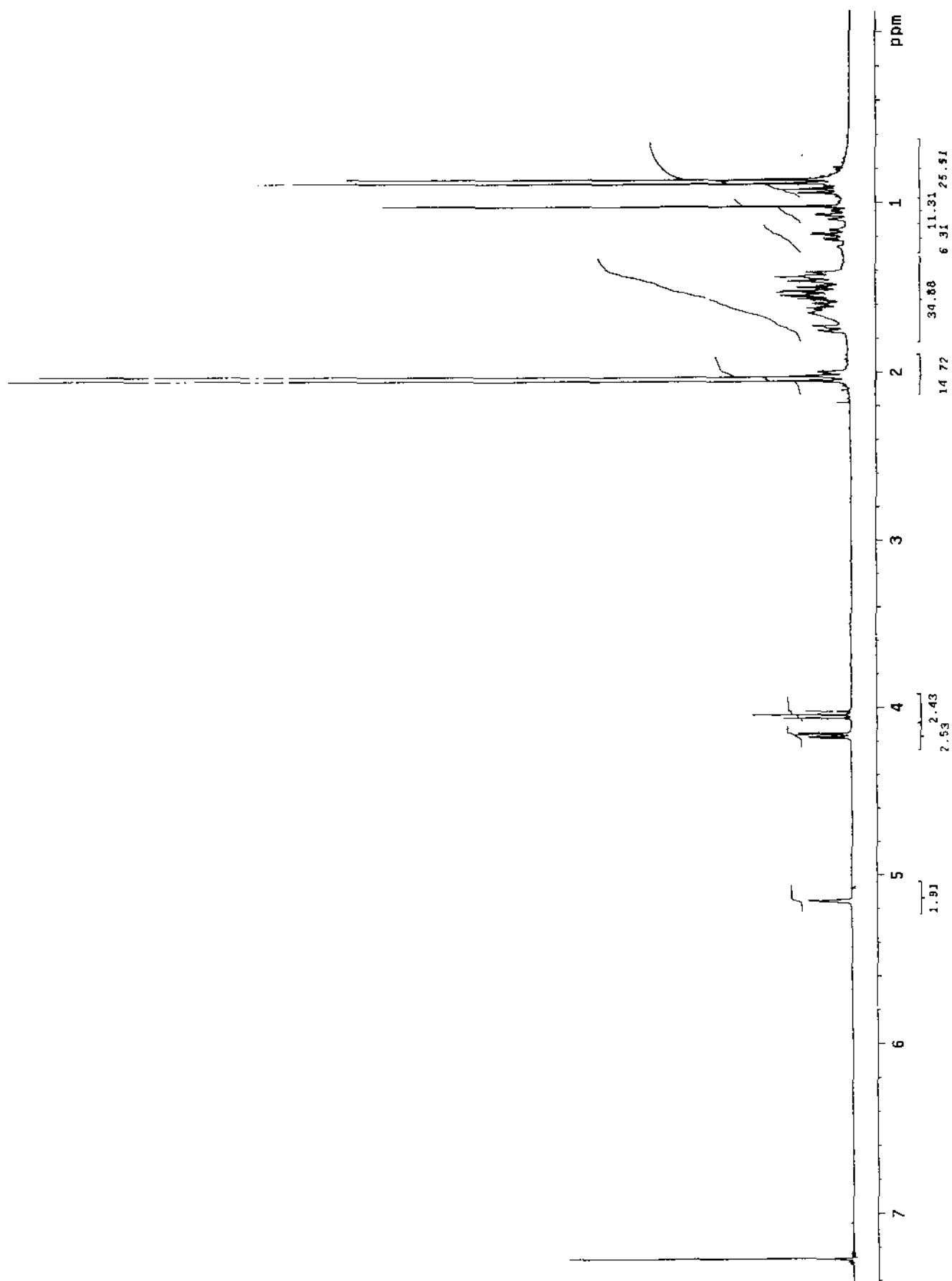


Fig. 3-151. Proton NMR spectrum of compound VJP-6-J.

제 7 절 해면 *Aplysinella rhax*의 대사물질

1. 서 론

Guam 대학교의 해양생물연구진에 의하여 '96년 8월 Guam섬 서해안의 Sponge Mound 라 불리는 해역의 수심 20-30 m의 장소와 '97년 1월 Pohnpei섬 연안의 수심 25-30 m에서 채집된 해면동물 *Aplysinella rhax*(시료 번호 각각 VJP-2와 VJP-3)는 분류학상으로 Verongida 목(order)의 Aplysinellidae 과(family)에 속한다. Verongida목에 속하는 해면동물들의 형태 및 생화학적 특성이 이들을 별개의 목으로 인정하기에 충분한가 아니면 계통상으로 유사한 Dictyoceratida 목에 속하는 하나의 과(family)인 Verongidae로 분류하는 것이 더욱 타당한가 하는 것은 오랫동안 분류학자들 간의 논란의 대상이 되어 왔다. 이 논쟁은 70년대 말에 별개의 분류군으로 취급하는 것이 타당하다는 주장이 인정을 받게 되어 현재는 거의 모든 분류학자들이 Verongida목의 존재를 인정하고 있다(Bergquist & Wells, 1983).

이 종류에 속하는 해면들이 분류학상으로 하나의 독립된 목으로 인정받게 만든 여러 가지 요인 중에서 가장 중요한 것은 이들의 체내에서 대사작용에 의하여 생성되는 천연물의 생합성적 기원과 구조적 특징이었다. 즉 Verongida에 속하는 중요한 해면들인 *Aplysina*, *Aplysinella*, *Ianthella*, *Psammoplysilla*, *Pseudoceratina*, *Thorectopsamma*, *Verongula* 등으로부터 분리된 2차 대사물질들은 -steroids, 지방산 등 일반적으로 해면을 비롯한 여러 종류의 해양생물에서 공통적으로 발견되는 물질을 제외하고 - 모두 bromotyrosine에서 기원한 물질들이다(Fig. 3-152). 일종의 변형된 아미노산인 bromotyrosine에서 기원한 물질들은 Verongida를 제외한 다른 해면에서는 극히 드물게 발견되고 있으며 그러한 경우에도 분리한 물질의 양이 매우 적어 채집된 시료의 화학적 동질성(chemical homogeneity)를 의심받고 있다. 반면 Verongida로부터 분리된 bromotyrosine 유도체들은 일반적으로 체내의 농도가 매우 높으며(시료의 건조 중량의 1% 이상) 구조적인 면에서도 매우 다양하다. 또한 이들은 생물의 종이나 채집 환경, 계절적인 변화, 지리적인 요인 등에 무관하게 항상 발견되고 있다(idiosyncratic chemicals Gerhart, 1984). 따라서 현재 bromotyrosine 유도체들은 Verongida목의 화학분류학적 지표(chemosystematic marker)로 불리우고 있다(Bergquist & Wells, 1983).

천연물화화학적 측면에서 Verongida목의 bromotyrosine 유도체들은 매우 중요하게 취급되고 있다. 그것은 이들이 화학구조적으로 매우 다양할 뿐만 아니라 흔히 항암, 항바이러스, 효소저해, 항진균, 항박테리아 등 여러 종류의 생리활성을 갖고 있으며 어류나 연체동물 등 해면동물에 대한 잠재적 포식자에 대한 포식억제(feeding deterrent)등 생태학적 작용도 함께 갖고 있기 때문이다(Faulkner, 1997; Paul, personal commun.). 따라서 현재 외국의 해양천연물 연구진 중에는 이들을 중요한 연구대상으로 하는 곳이

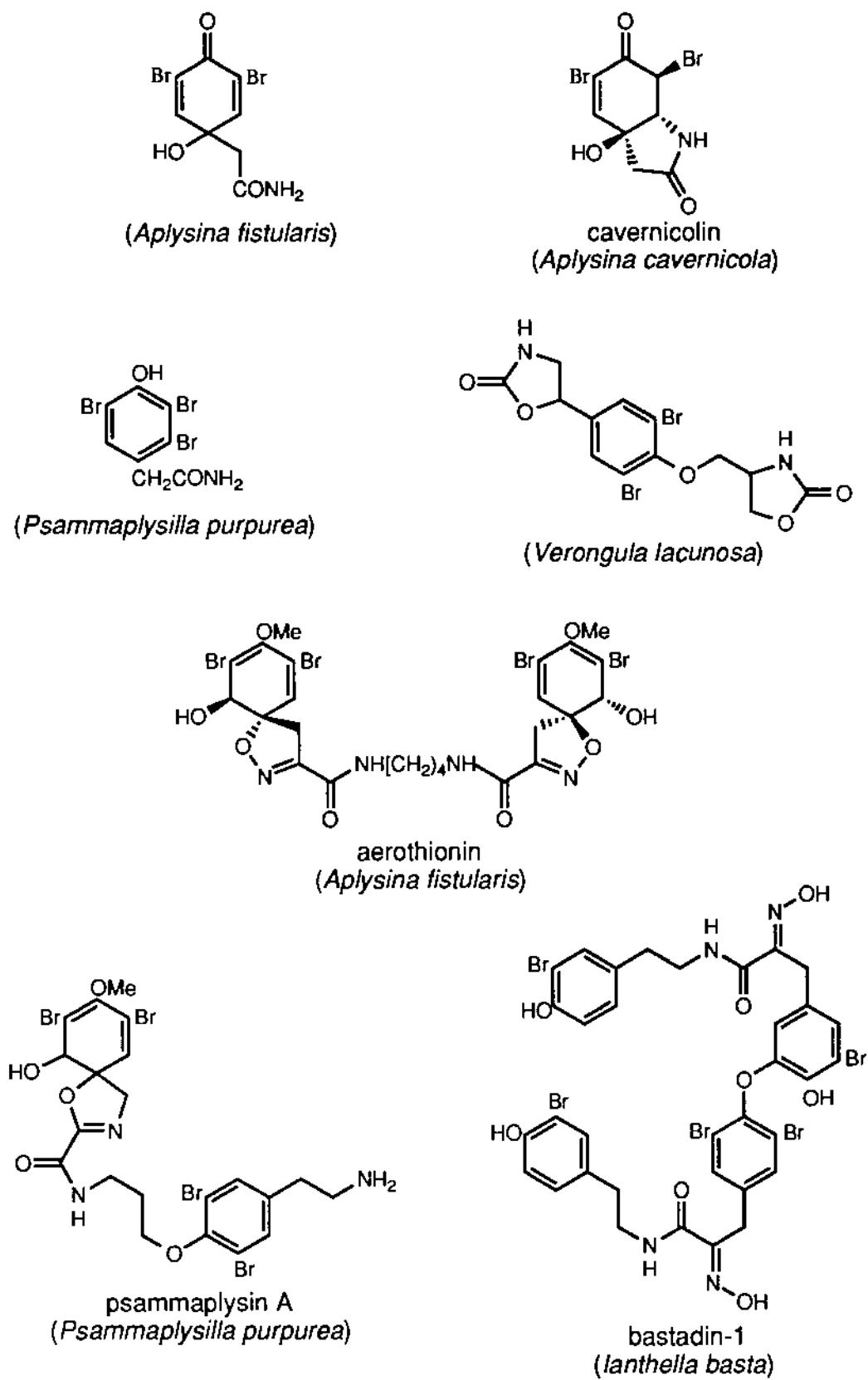


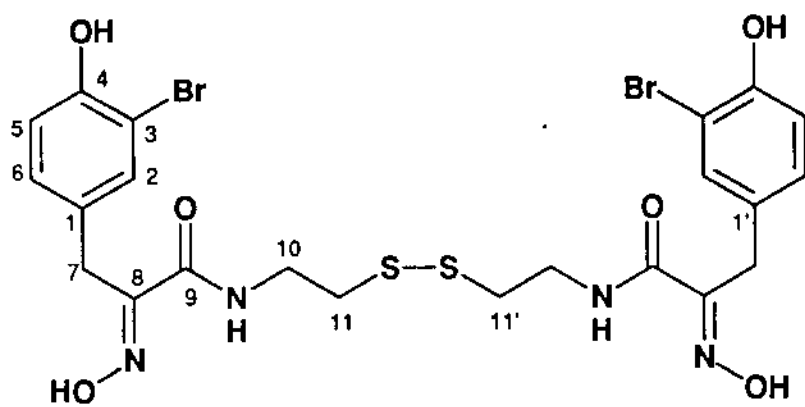
Fig. 3-152. Bromotyrosine-derived metabolites from sponges of the order Verongida.

많다. 그러나 이 목의 해면들은 주로 적도 주변의 열대나 아열대성 해역에 서식하고 있어서 한국 근해에서는 발견되지 않고 있다(심정자, personal commun.). 그러므로 본 연구에서 열대 해역에서 채집된 Verongida목의 해면 *Aplysinella rhax*를 연구대상으로 삼은 것은 신물질 탐색의 측면에서뿐만 아니라 국내의 천연물 연구영역의 확대를 위해서도 매우 중요한 일로 생각된다.

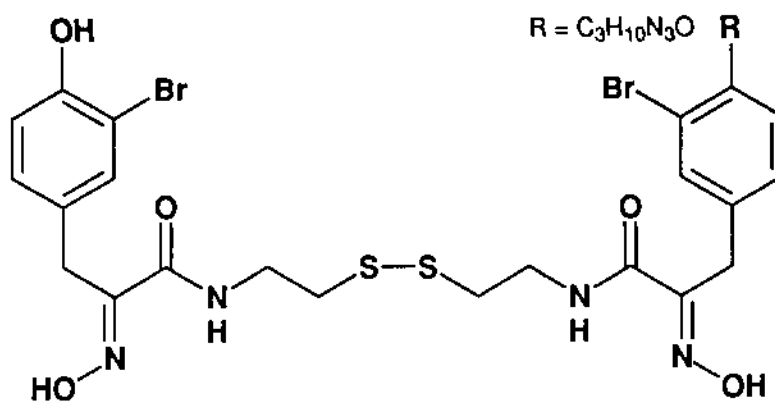
연구결과를 먼저 요약하면 해면 *A. rhax*로부터 8 종의 bromotyrosine계 alkaloids를 분리하였다. 여러 종류의 작용기를 가진 이들의 구조결정은 대단히 어려웠으나 여러 종류의 1D, 2D 및 3D NMR 실험(^1H , ^{13}C , ^{15}N , DEPT, N-DEPT, ^1H COSY, N-H COSY, TOCSY, HMQC, HSQC, gHMBC, NOESY, ^1H -selective INEPT, SIMBA, HMQC-TOCSY) 등을 총망라한 분광자료의 다각적인 해석과 문헌조사에 의하여 이들이 1 종의 알려진 물질인 psammaplins A(VJP-3-A)와 7 종의 신물질(VJP-3-A1, -B, -C, -C1, -D, -E, -F)임을 밝혔으며 화학적 구조에 대해서도 확신을 갖게 되었다. 신물질들의 명칭은 알려진 물질의 명칭과의 구조적 연관에 따라 psammaplins A1(VJP-3-A1), B(VJP-3-B), C(VJP-3-C), C1(VJP-3-C1) 및 D(VJP-3-E)로 명명하였다. 그러나 다른 두 종의 물질은 psammaplins에 비하여 크기가 훨씬 크고 기존의 해양천연물에서 찾아볼 수 없는 여러 가지의 독특한 부분구조를 갖고 있었으므로 aplysinellins A(VJP-3-D)와 B(VJP-3-F)로 다르게 명명하였다.

집중적인 NMR 실험에 의하여 구조를 제시할 수 있음에도 불구하고 너무나 다양한 원자들(C, H, O, N, S, Br, Cl)과 유레가 드물거나 전혀 새로운 작용기로 구성된 이들은 일반적인 조건(EI, CI, positive and negative FAB, tandem FAB)에서는 정확한 고해상 질량분석자료를 획득하는 것이 대단히 어려워 현재까지 분자식의 규명이 완료된 것은 알려진 물질 VJP-3-A와 신물질 VJP-3-B에 불과하다(Fig. 3-153). 나머지 천연물들은 ESIMS 등 새로운 질량분석실험을 시도하기 위하여 이 분야의 전문 연구기관인 미국의 The Mass Spectrometry Facility, University of California, Riverside에 분석을 의뢰하고 그 결과를 기다리고 있는 실정이다. 따라서 현재까지 이들 중 대부분에 대한 공식적인 구조결정이 완료된 것이 아니다.

그러므로 비록 본 과제의 연구기간이 완료되기는 하였으나 본 최종보고서에 이들의 완전한 구조를 보고하는 것은 불가능하며 불충분한 분광자료에 의하여 규명된 -비록 그들의 구조에 대하여 확신을 갖고 있으나- 구조를 삽입하거나 완전한 NMR 자료를 보고하는 것은 옳지 못하며 향후 이들에 대한 물질 및 용도특허의 출원과 함께 기타 산업적 개발의 가능성 제고 및 학술지에 게재를 하기 위하여도 바람직하지 않은 것으로 사료된다. 따라서 본 보고서에서는 알려진 물질인 psammaplins A(VJP-3-A)에 대해서만 구조와 분광자료를 보고하고 나머지 신물질에 대해서는 ^1H 와 ^{13}C NMR 자료의 일부만 실험방법만에 보고하고 일체의 NMR spectra를 첨부하지 않기로 한다. 또한 수록한 NMR 자료도 보안을 위하여 여러 수소 및 탄소 signals의 chemical shifts와 splitting patterns(multiplicity)를 고의로 누락 혹은 변경시킨 것임을 미리 밝혀둔다.



VJP-3-A(psammaplin A)



VJP-3-B(psammaplin B)

Fig. 3-153. Structures of psammaplins A and B.

천연물의 구조 결정과 더불어 생리활성의 측정도 함께 진행되고 있는 바 현재까지 획득한 자료에 의하면 이들은 모두 혈액암 세포(K562)에 대하여 매우 강한 독성을 나타내고 있다(LC₅₀ << 1 μg/mL). 이와 더불어 생리활성의 기작을 전문 연구기관에 의뢰(미국의 National Institute of Health와 State University of New York, Stony Brook)한 결과 psammaplin B가 microtubule에 대해서는 아무런 작용이 없으나 actin에 대한 강한 binding을 하며 그 기작이 여타의 천연물과는 매우 상이한 것을 발견하여 현재 후속연구가 진행중이다(Spector, personal commun.).

이 들 해면동물 *A. rhax*로부터 분리된 8 종의 천연물에 대해서는 신뢰할 수 있는 질량분석자료의 획득과 생리활성의 검색을 완료하는 즉시 물질특허의 출원과 저명학술지에의 투고를 할 계획이다: aplysinellins A & B for *J. Am. Chem. Soc.* (communication); psammaplins for *Tetrahedron*(full paper).

2. Bromotyrosine alkaloids의 분리 및 구조 결정

해면 *aplysinella rhax*는 '96년 8월에 미국령 Guam의 Sponge Mound라고 불리는 지역의 수심 20-30 m(시료번호 VJP-2)와 '97년 1월 Pohnpei섬 연안의 수심 25-30 m(시료번호 VJP-3)에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 이 들 시료는 처음에 각각 독립적으로 취급되었으나 형태학적 특성이 서로 완전히 일치하였으며(Kelley-Borges, personal commun.) 조추출물의 ¹H NMR 자료도 동일하였다. 따라서 두 가지 시료를 합하여(시료번호 VJP-3) 화학적 분석과 천연물의 분리를 시도하였다.

질은 청녹색의 부정형 덩이를 이루는 이 시료는 채집 즉시 현장에서 드라이아이스를 이용하여 냉동시킨 후 이 상태에서 Guam대학의 Marine Laboratory로 운반되어 freeze dryer를 이용하여 동결 건조시킨 후 항공편으로 본 연구진으로 운송되었다. 생리활성도 측정 결과 *A. rhax*의 조추출물은 brine-shrimp larvae에 대하여 상당히 강한 독성(LD₅₀ 85 ppm)을 나타내었다.

동결 건조된 시료에 대하여 methanol과 dichloromethane을 반복적으로 가하여 유기 물질을 추출하였다. 각각의 용매를 증발시킨 후에 합한 조추출물을 물과 n-butanol의 분획을 이용하여 염과 기타의 수용성 불순물을 제거하였다. n-Butanol층은 감압건조시킨 후 n-hexane과 10% aqueous methanol의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였으며 aqueous methanol 층은 다시 reversed-phase vacuum flash chromatography와 reversed-phase HPLC 등을 반복적으로 이용하여 2차 대사물질을 분리하였으며 이 과정에서 각각의 분액에 대한 brine-shrimp에 대한 독성 실험과 ¹H NMR spectrum으로 생리활성 물질을 추적하였다. 이러한 방법으로 알려진 물질인 psammaplin A(VJP-3-A)와 신 물질인 psammaplins A1(VJP-3-A1), B(VJP-3-B), C(VJP-3-C), C1(VJP-3-C1), D(VJP-3-E), aplysinellins A(VJP-3-D), B(VJP-3-F) 등 합계 8 종의 alkaloids를 분리

하였다 이들의 생물체 내의 농도는 그 차이가 매우 커서 주 대사물질인 psammaplins A 및 B는 분리된 양이 각각 1,532 mg(사료 건조중량의 1.00%)과 1,719 mg(1.12%)에 달하였으나 나머지 물질은 15-25 mg 정도만 분리되었고 미소(trace) 대사물질인 psammapiin 시의 경우는 4.8 mg(0.003%)에 불과하였다.

질은 황색의 고체로 분리된 물질 VJP-3-A는 LRFABMS 분석에서 m/z 665에 $[M+H]^+$ 혹은 $[M+Na]^+$ 로 생각되는 큰 peak(relative intensity 100)를 나타내었다(Fig. 3-154). 또한 이 peak 주변의 m/z 663과 667에도 두 개의 상당히 큰 peak가 발견되었으며 각각의 크기에 대한 상대적인 비는 $663/665/667 = 1:1.93:0.95$ 즉 1:2:1에 근접하였다. 이 현상은 두 개의 bromine 원자가 함유된 물질의 전형적인 질량분석 패턴에 해당하는 것으로서 시료 VJP-3이 분류학상으로 Verongida 목에 속하며 따라서 VJP-3-A도 전형적인 bromotyrosine 유래의 alkaloid임을 의미하는 것으로 생각되었다. 고해상 질량분석에서 m/z 665의 peak는 664.9566으로 나타났는데 두 개의 bromine을 포함시켜 천연유기물에서 흔히 발견되는 주요 원소(C, H, N, O, S, Cl)에 대한 고해상 원자질량계산을 한 결과 이 peak는 $C_{22}H_{25}^{79}Br^{81}BrN_4O_6S_2$ (계산값, 664.9562, Δ -0.4 mmu)에 해당하며 따라서 물질 VJP-3-A의 분자식은 $C_{22}H_{24}Br_2N_4O_6S_2$ 으로 생각되었다. 그러나 이 물질의 ^{13}C NMR spectrum에서는 단지 11개의 signals 만이 발견되었다(Fig. 3-155). 그러므로 VJP-3-A는 11 개의 탄소로 이루어진 두 개의 동일한 부분이 선형으로 연결되어 있는 일종의 대칭물질(symmetric compound)로 결론이 내려 졌다.

물질 VJP-3-A의 분자식은 12 개의 불포화도(unsaturation degree)를 나타내었는데 이러한 높은 불포화도는 이 물질의 ^{13}C NMR 자료에서 많은 signals가 δ 150-110 region에 모여있는 것과 일치하며 최소한 두 개의 aromatic part가 존재하는 것을 나타내었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 δ 134.41, 130.33, 116.94 등에 세 개의 methine signals가 나타났으며 이 들에 대하여 상응하는 signals가 1H NMR spectrum에서 δ 7.37(d, $J = 1.9$ Hz), 7.06(dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz), 6.73(d, $J = 8.1$ Hz)에서 발견되었다(Fig. 3-156). 이 들 세 protons의 낮은 chemical shifts와 특징적인 coupling constants는 1,2,4-trisubstituted benzene에서 흔히 나타나는 현상으로서 물질 VJP-3-A가 bromotyrosine에서 유래한 천연물임을 더욱 명확히 하였다.

이 상의 정보를 바탕으로 하여 이 천연물의 구조는 2D NMR 실험과 문헌조사에 의하여 결정되었다. 먼저 1H COSY 실험에서 전기한 세 protons 간의 ABX 형태의 coupling이 발견되어 1,2,4-trisubstituted benzene의 존재가 확인되었다. 또한 HMBC 실험에서 이 들 세 수소와 δ 153.04(C, C-4), 134.41(CH, C-2), 130.53(C, C-1), 130.33(CH, C-6), 116.94(CH, C-3), 110.43(C, C-5) 등에 나타난 여러 탄소간의 long-range coupling이 잘 나타났는데 C-4 탄소의 -aromatic carbon 으로서는 대단히 낮은 chemical shift (δ 153.04)와 인접한 C-3 및 C-5 탄소의 높은 chemical shifts(δ 116.94, 110.43)는 hydroxyl기와 bromine 원자가 각각 aromatic ring의 C-4와 C-3에 결합되어 있음을 의미하였다. 또한 HMQC 실험에 의하여 ^{13}C NMR 자료에서 δ 28.69에 나타난 methylene

carbon에 상응하는 proton signals가 ^1H NMR spectrum에서 $\delta 3.78(2\text{H}, \text{s})$ 에 나타난 것은 benzylic methylene으로 생각되었다. 이 해석을 지지하는 주요한 증거는 HMBC 실험에서 이 benzylic methylene을 이루는 탄소 및 수소와 aromatic ring의 C-1, C-2, C-6에 해당하는 탄소 및 수소원자 간의 여러 correlations가 발견된 점이다. 또한 동일한 methylene protons는 $\delta 165.77(\text{C})$ 과 $153.65(\text{C})$ 에 나타난 downfield carbons와도 H-C correlations를 보여주었다. 이 현상은 비록 작용기는 명확하지 않았으나 두 탄소가 benzylic methylene기의 α 와 β 에 선형으로 연결되어 있음을 의미하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 $\delta 39.57$ 과 38.51 에 나타난 탄소 signals와 이들에 상응하여 ^1H NMR 상에서 각각 $\delta 3.52(2\text{H}, \text{t}, J = 6.8 \text{ Hz})$, $2.79(2\text{H}, \text{t}, J = 6.8 \text{ Hz})$ 에 나타난 signals는 spin system상 하나의 독립된 ethylenyl group이 존재하는 것으로 생각되었다. 이들 각각의 methylenes는 ^{13}C NMR shifts가 매우 유사함에도 불구하고 ^1H shifts는 $\delta 3.52$ 와 2.79 로 큰 차이를 보여주었다. 이것은 ethylenyl group의 양쪽에 붙어있는 작용기의 전기음성도가 서로 상이함에서 기인한 것으로 해석되었다. 물질 VJP-3-A의 분자식과 이미 구조가 결정된 부분의 부분(partial) 분자식으로부터 $\delta 3.52$ 의 methylene에는 질소원자가 그리고 $\delta 2.79$ 의 methylene에는 황 원자가 각각 연결되어 있음을 유추할 수 있었다 (산소나 탄소 등 그 밖의 원자로 이루어진 작용기가 접합되어 있을 경우에는 수소나 탄소의 chemical shifts가 맞지 않음; Jackman & Sternhell, 1969; Wehrli & Wirthlin, 1978; Kalinowski, et al, 1988). 이 해석을 증명하기 위하여 NMR 용매를 DMSO- d_6 로 바꾼 결과 하나의 새로운 NH proton signal이 $\delta 7.97(1\text{H}, \text{t}, J = 6.3 \text{ Hz})$ 에 나타났으며 MeOH- d_4 에서 $\delta 3.52(2\text{H}, \text{t}, J = 6.8 \text{ Hz})$ 에 나타난 proton signal이 $\delta 3.65(2\text{H}, \text{tt}, J = 7.3, 6.3 \text{ Hz})$ 로 이동되었다. 그러나 MeOH- d_4 에서 $\delta 2.79(2\text{H}, \text{t}, J = 6.8 \text{ Hz})$ 에서 관찰되었던 signal은 $\delta 2.72(2\text{H}, \text{t}, J = 7.3 \text{ Hz})$ 에서 나타나 chemical shift와 coupling pattern의 큰 변화가 없었다. NH 수소와의 큰 coupling은 MeOH- d_4 에서 $\delta 3.52$ 에 나타난 methylene에 NH기가 직접 붙어 있음을 의미하는 것이며 이 수소 원자와 $\delta 165.77$ 에 나타난 탄소 원자간의 HMBC correlation은 NH가 amide를 형성하고 있음을 밝힘과 동시에 전기한 benzylic methylene(^1H $\delta 3.78$; ^{13}C 28.69)의 β 위치에 이 amide carbonyl이 존재하며 독립된 proton spin system을 가진 ethylene기가 이 amide기와 $\delta 153.65$ 에 나타난 carbon(C-8)을 거쳐 aromatic ring의 benzylic position(C-7)에 연결되는 것을 밝힌 직접적인 증거가 되었다.

물질 VJP-3-A의 분자 구조에서 남은 문제점은 ^{13}C NMR spectrum에서 $\delta 153.65$ 에 나타난 탄소의 작용기의 규명과 동일한 partial structures 사이의 연결점을 밝히는 일이었다. 이 물질의 분자식에서 남은 원소는 하나의 산소와 하나의 수소원자에 불과하였다 (대칭물질이므로 분자식을 1/2로 나누었을 경우). 따라서 분자식을 만족하면서 $\delta 153.65$ 의 낮은 chemical shift에 가장 합당한 작용기는 하나의 oxime기였다. 따라서 이 탄소에 대한 최종적인 작용기의 선정 및 이와 연동되는 대칭구조 간의 접합점에는 두 가지 가능성이 존재하였다. 즉 oxime기가 free하게 존재하고 S-S disulfide bond에 의

한 두 대칭구조의 연결이 가능하였으며 다른 하나의 가능성은 두 개의 oxime을 이루는 산소원자 간의 dioxide 결합(이 경우 sulfur는 thiol로 존재)이었다. 그러나 전기음성도가 매우 큰 4 개의 원자가 -C=N-O-O-N=C-의 형태를 구성하여 선형으로 연결되는 것은 상례를 벗어나는 것이므로 후자의 가능성은 자연히 배제되고 oxime기의 존재와 sulfide linkage에 의한 연결이 더욱 합당하였다. 이와 같이 하여 천연물 VJP-3-A의 구조는 bromotyrosine에서 출발한 C₁₁ 부분구조를 가진 대칭적 alkaloid로 결정되었다(Fig. 3-153).

이상의 질량분석과 NMR 해석을 토대로 제시된 구조를 바탕으로 하여 문헌과 STN database에 대한 조사를 한 결과 VJP-3-A는 bromotyrosine에서 기원한 dimeric compound인 psammaphin A와 동일한 물질임이 드러났다. 이 물질은 해면 *Psammaphysilla* sp.로부터 최초로 분리되었으며 동일한 시기에 *Thorectosamma xana*에서도 발견된 바가 있다(Quinoa & Crews, 1987; Rodriguez, et al, 1987). 본 연구전에서는 현재 K562에 대하여 강한 세포독성(LC₅₀ 0.13 µg/mL)을 나타내는 이 물질의 광범위한 생리활성을 자체적으로 혹은 전문기관에 의뢰하여 측정 중이다. 또한 그 작용 기작의 규명을 위하여 외국의 전문기관(미국의 National Institute of Health와 State University of New York, Stony Brook)에 의뢰한 결과 세포내의 microtubule에 대해서는 binding affinity가 없으나(NIH) actin에는 대단히 잘 결합하며 그 mode가 여타의 천연물과는 다른 점이 많다(SUNY)는 회신을 받았다(Hamel, personal commun.; Spector, personal commun.). 한편 해면동물 *A. rhax*에서 대단히 높은 농도로 존재하는 이 대사물질의 포식억제 및 기타 생태학적 작용 효과를 규명하기 위하여 '98년 9월에 Guam 대학교의 연구진과 공동으로 생태학적 현장 실험을 수행하였다. 그 결과 산호초에 서식하는 열대성 어류들에 대한 강한 포식억제 효과를 확인하였으나 이 물질의 대단히 높은 극성에 기인한 해수에 대한 높은 용해도로 인하여 정량적으로 신뢰할 수 있는 결과의 획득에는 성공하지 못하였다(조기용 & Paul, personal commun.).

Psammaphin A(VJP-3-A)의 구조와 분광자료에 있어서 덧붙여 언급코자 하는 사실은 carbon NMR spectrum에서 11개의 carbon signals가 관찰되었다는 점이다. 다른 해양생물과는 달리 해면동물로부터는 11개 혹은 이것의 배수에 해당하는 탄소를 가진 alkaloids가 드물지 않게 발견된다. 이들은 거의 전부가 bromotyrosine 등 brominated amino acid에 기원하거나 oroidin-scepterin 계열이나 aldysin-phakellin 계열처럼 bromopyrrole 부분을 가진 물질들로서 강력하고 다양한 생리활성을 갖고 있는 경우가 많다(Cafieri, et al, 1996a; 1996b; 1997; 1998; Faulkner, 1996; 1997; Kobayashi, et al, 1997a; 1997b; Mancini, et al, 1997b; Tsukamoto, et al, 1996c; Walker, et al, 1981; Williams & Faulkner, 1996). 그러나 bromotyrosine 자체는 C₉으로 구성되어 있으며 bromopyrrole은 C₅만으로 구성되어 있는데도 불구하고 전자의 경우는 하나의 C₂ unit를 그리고 후자의 경우에는 하나의 C₆ unit를 amide bond로 aromatic ring에 연결시켜 최종적으로는 항상 C₁₁이나 이의 배수에 해당하는 수의 탄소를 가진 천연물이

생성되는 것은 생합성적 측면에서 너무나도 흥미로운 일이다(Faulkner, 1996; 1997).

유사한 천연물인 psammaphin A(VJP-3-A)이 노란 색의 반고형(gum) 형태로 분리되었다. 이 물질의 NMR 자료는 psammaphin A와 대단히 유사하였다. ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 1D와 2D NMR 자료는 이 천연물이 psammaphin A와 완전히 동일한 3-bromo-4-hydroxy-toluene과 oxime, N-thioethyl amide 등의 부분구조를 갖고 있으며 그 평면적 배열 또한 완전히 동일함을 나타내었다. 그러나 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 자료의 세밀한 비교는 몇 개의 signals의 chemical shifts에 있어서 기계적인 오차일 것으로 무시할 수 없는 차이가 남을 발견하였다. 또한 이러한 현상은 C-10 ethylenyl기에 해당하는 부분에서 더욱 큰 것을 확인하였다: $\Delta(\text{VJP-3-A} - \text{A1}) +0.43$ and $+2.92$ ppm for C-10 and C-11, respectively; -0.07 and $+0.16$ ppm for H-10 and H-11, respectively. 따라서 C-11에 결합된 disulfide linkage에 변화가 생겼음을 알 수 있었다. 유일한 가능성은 물질 VJP-3-A1은 psammaphin A와 같은 대칭구조의 절반만으로 이루어진 monomer인 것이다. 실제로 bromotyrosine계 alkaloids 중에는 monomer와 dimer가 함께 분리되는 예가 드물지 않다(Rodriguez, et al, 1987; Faulkner, 1996). 이러한 경우에 흔히 disulfide bond가 끊어지면서 thiol, thiocyanate, isothiocyanate 등의 작용기로 변화한다. Thiocyanate나 isothiocyanate 등의 작용기에는 하나의 탄소원자가 추가되어 있으나 이 탄소원자의 relaxation time이 매우 길어 ^{13}C NMR 실험에서 발견하기가 쉽지 않다(Kalinowski, et al. 1988). 이 문제는 고해상 질량분석에 의하여 정확한 분자식이 얻어지면 해결될 것으로 예상된다.

Psammaphin A에 버금가는 주 대사물질인 psammaphin B(VJP-3-B)가 짙은 노란색의 무정형 고체로 얻어 졌다. 이 천연물의 분자식은 다양한 질량분석 실험과 ^{13}C NMR 분석에 의하여 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{Br}_2\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_2$ 로 결정되었다: HRFABMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 752.0381(calculation 752.0358, Δ -2.3 mmu)(Fig. 3-157). 이 물질의 ^{13}C NMR spectrum에서는 모두 23 개의 탄소 signals가 발견되었다(Fig. 3-158). 이들 중 대부분은 psammaphin A와 동일하거나 유사한 chemical shifts를 나타내었으므로 VJP-3-B가 psammaphin A의 유도체라는 것이 드러났다. 그러나 모든 signals이 서로 겹쳐지지 않고 어느 정도의 편차를 나타내는 것으로 미루어 psammaphin A를 이루는 2개의 half-structures가 동일하지 않은 것을 알 수 있었다. 특히 서로 쌍을 이루는 탄소들의 chemical shifts 중에서 어느 하나는 VJP-3-A와 완전히 동일한 것으로 미루어 보아 2 개의 half-structures 중의 하나는 VJP-3-A의 half-structure와 동일하며 구조적인 변화는 나머지 하나의 half-structure에서 일어난 것을 알 수 있었다.

^{13}C NMR spectrum에서 나타난 VJP-3-B의 특징들은 ^1H NMR과 ^1H COSY data에서도 드러났다(Fig. 3-159). 먼저 VJP-3-A와는 달리 6 개의 signals이 aromatic region(δ 7.5-6.5)에 존재하였다. Proton COSY NMR에서 이들은 2 개의 서로 독립된 ABX spin system을 이루고 있음이 드러났으므로 2 개의 1,2,4-trisubstituted benzene으로 해석되었다. 이러한 해석은 HMQC와 HMBC 실험에 의하여 증명되었다. 즉 6 개의 aromatic

Table 3-6. Proton and carbon NMR assignments for psammaplin B(VJP-3-B).

#	H	C	HMBC (8 Hz)
1		130.55	
2	7.36 (1H, d, 2.0)	134.42	3, 4, 6, 7
3		110.43	
4		153.65	
5	6.75 (1H, d, 8.3)	116.98	1, 3, 4
6	7.06 (1H, dd, 8.3, 2.0)	130.32	2, 4, 7
7	3.78 (2H, s)	28.69	2, 6, 8, 9
8		153.03	
9		165.80	
10	3.51 (2H, t, 6.8)	39.65 ^a	9, 11
11	2.80 (2H, t, 6.8)	38.56 ^b	10
1'		136.04	
2'	7.49 (1H, d, 2.0)	134.62	1', 3', 4', 6', 7'
3'		116.48	
4'		149.57	
5'	7.47 (1H, d, 8.8)	123.27	1', 3', 4'
6'	7.21 (1H, dd, 8.8, 2.0)	130.00	2', 4', 7'
7'	3.86 (2H, s)	28.99	1', 2', 6', 8', 9'
8'		152.54	
9'		165.63	
10'	3.51 (2H, t, 6.8)	39.58 ^a	9', 11'
11'	2.80 (2H, t, 6.8)	38.48 ^b	10'
12'		158.61	
Me	3.02 (3H, s)	38.28	12'

Proton and carbon NMR data were measured in CD₃OD solutions at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H COSY, HMQC, and DEPT experiments. ^a Interchangeable signals.

protons와 인접한 carbons와의 direct- 및 long-range H-C correlations이 다수 발견되었으므로 aromatic rings와 그에 존재하는 탄소 및 수소가 모두 정확히 지정되었다.

Multidimensional NMR 실험의 결과에 따르면 2 개의 aromatic rings중 하나에 해당하는 탄소 및 수소들은 chemical shifts가 psammaplin A와 대단히 유사하였으나 다른 하나의 고리에 존재하는 탄소와 수소는 변화가 상당히 심하였다. HMQC와 HMBC 실험에 의하여 지정된 signals를 바탕으로 하여 구체적으로 살펴보면 먼저 ¹H NMR spectrum에 있

어서 δ 7.36(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.06(1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 6.75 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5) 등에 나타난 세 signals로 이루어진 spin system은 VJP-3-A 와 거의 일치하였으나 δ 7.79(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.41(1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 7.31(1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6') 등의 세 수소는 비록 동일한 1,2,4-trisubstituted benzene 이라도 chemical shifts에 있어서 큰 차이를 나타내었다. ^{13}C NMR data 에서도 동일한 변화가 관찰되어 δ 151.57(C, C-4'), 135.04(C, C-1') 134.62(CH, C-2'), 125.00(CH, C-6'), 112.27(CH, C-5'), 111.48(C, C-3') 등 여섯 개의 탄소는 chemical shifts에 있어서 상당한 편차를 보여주었다.

NMR 자료의 종합적인 해석으로부터 물질 VJP-3-B의 구조에 있어서 aromatic ring 을 제외한 다른 부분은 VJP-3-A와 동일한 것으로 해석되었다. Non-aromatic parts를 이루는 carbon과 proton signals의 chemical shifts, signal multiplicity(carbon), splitting pattern(proton) 등에 있어서 두 물질은 거의 동일하였다. 또한 2D NMR 실험 에 있어서 VJP-3 B가 -A와 완전히 동일한 oximes, thioethyl amides, disulfide linkage를 갖고 있음이 여러 개의 H-H, H-C correlations로 증명되었으므로 전기한 NMR 상에서의 aromatic signals의 변화는 ring에 존재하는 substituents가 변한 것으로 해석되었다. ^{13}C NMR spectrum에 있어서 각각의 aromatic signals를 VJP-3-A와 세밀히 비교해 본 결과 C-1', C-3', C-4', C-5'에 해당하는 carbons들은 수 ppm 정도의 편차를 나타낸 데 비하여 C-2', C-6'에서는 변화가 거의 없었다(Table 3-6). 유일한 해석은 VJP-3-A의 B ring(left)의 C-4' hydroxyl기가 다른 작용기로 변화하였고 이에 따라, C-4'의 (*ortho* 및 *para* 위치에 각각 해당하는 C-4', C-3'와 C-5', C-1' 등에서는 상당한 chemical shifts의 변화가 나타나는 반면 *meta* 위치에 해당하는 C-2'와 C-6' 는 별다른 차이를 나타내지 않는 것으로 생각되었다. 그러므로 psammaplin B는 psammaplin A의 C-4 hydroxyl기가 다른 작용기로 변한 유도체임이 분명하였다. HRFABMS 분석에서 VJP-3-A에 비하여 VJP-3-B는 $\text{C}_2\text{H}_9\text{N}_3$ 에 해당하는 질량이 추가되어 있으므로 이들로 구성된 작용기가 C-4'에 접합되어 있는 것으로 해석되었다(Fig. 3-153).

이 추가된 부분의 구조는 ^{15}N NMR, ^{15}N -DEPT, N-H COSY 등 질소 NMR 자료의 해석과 화학적 반응에 의하여 결정되었으며 STN database 조사에 의하여 psammaplin B가 신물질임을 확인하였다. 그러나 이 물질의 생리활성에 대한 검색이 완료되지 않았으므로 여기서는 생략한다.

유사한 물질인 psammaplin C(VJP-3-C)가 황색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 ^{13}C NMR data에서는 단지 12개의 signals 만이 발견되었으며 ^1H NMR spectrum도 매우 단순 하였다. 이들 NMR 자료를 다른 물질에 대한 자료와 세밀히 비교해 본 결과 ^1H 와 ^{13}C NMR 자료들 모두가 psammaplin B(VJP-3-B)의 western part(C-1'~12')와 완전히 일치함을 발견하였다. 또한 ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 2D NMR 실험에서도 VJP-3-B와 완전히 동일한 H-H 및 H-C correlations가 발견되었다. 따라서 물질 VJP-3-C는 VJP-3-B의 western part의 monomer이거나 혹은 한 쌍의 western part가 disulfide bond에 의하여

서로 결합된 dimer(psammaplin A의 경우처럼) 일 것으로 추측되었다. 그러나 C-11 methylene에 해당하는 탄소와 수소 signals의 chemical shifts가 VJP-3-B와 완전히 일치하였고 LRFABMS 에서도 m/z 약 840에 $[M-H]^+$ 로 추측되는 peak가 발견되었으므로 전자의 가능성은 자연히 부인되었으며 psammaplin C는 psammaplin B의 western part의 dimer로 생각되었다. 이 문제에 대한 최종 결론은 VJP-3-C의 정확한 분자식이 얻어지면 해결될 것으로 생각된다.

유사한 물질인 psammaplin C1(VJP-3-C1)이 노란색의 액체 형태로 분리되었다. 이 천연물의 NMR 데이터는 psammaplin C와 거의 일치하였다. 1,2,4-trisubstituted benzene, thioethylamide, oxime, N-methyl기 등 VJP-3-C에서 나타난 주요 작용기가 완벽히 갖추어져 있었다. 이 물질의 NMR 자료를 다른 천연물과 세밀히 비교해 본 결과 C-10 ethylenyl기에 속한 수소 및 탄소의 chemical shifts가 VJP-3-A1과 거의 일치한다는 것을 발견하였다. 따라서 물질 VJP-3-C1은 -VJP-3-A와 -A1의 관계와 마찬가지로 -VJP-3-C의 disulfide linkage가 끊어지면서 thiol, thiocyanate, isothiocyanate 등의 작용기로 변한 monomer로 추측되었다. 다른 psammaplins와 마찬가지로 이 문제의 해결은 정확한 고해상 질량분석 자료의 획득에 의하여 가능할 것으로 생각된다.

신물질 psammaplin D(VJP-3-E)가 연한 노란색의 고체 형태로 분리되었다. 이 물질의 NMR 자료는 다른 psammaplins와 상당한 유사점을 보여주었으나 몇 가지의 특이한 점이 발견되었다. 먼저 ^{13}C NMR spectrum에서 다섯 개의 methine carbons(δ 143.53, 134.43, 130.36, 116.98, 112.49)가 관찰되어 세 개(monomer나 symmetric dimer) 혹은 여섯 개(asymmetric dimer)의 methine 탄소 signals를 나타낸 다른 psammaplins과 큰 차이를 보여주었다. 이에 상응하는 변화가 1H NMR spectrum에서도 관찰되어 서로 잘 분리되는 다섯 개의 aromatic signals가 발견되었다: δ 7.36, 7.10, 7.06, 6.75, 6.54. 이 물질의 NMR 자료에 나타난 수소와 탄소의 chemical shifts와 splitting pattern, multiplicity 등을 다른 천연물의 자료와 세밀히 비교해 본 결과 VJP-3-E 역시 VJP-3-A나 -B와 완전히 동일한 eastern part를 갖고 있음을 알 수 있었으며 다차원 NMR 실험에서도 3-bromo-4-hydroxybenzene, oxime, thioethylamide 등의 존재가 명확히 드러났다. 따라서 VJP-3-E는 -A의 western part가 변화한 유도체임이 분명하였다. HMQC와 HMBC 실험에 의하여 이 천연물이 thioethylamide, disulfide bond, oxime 등의 작용기를 각각 한 쌍씩 보유하고 있는 사실이 밝혀졌으므로 이 물질의 구조상에서의 모든 변화는 western hemisphere의 benzene ring에 국한된 것으로 해석되었다. 1H COSY, HMQC 및 HMBC 자료의 조합에 의하여 eastern part의 3-bromo-4-hydroxybenzene에 해당하는 모든 탄소가 정확히 지정되었으므로 ^{13}C NMR 상에 있어서 western benzene에 해당하는 signals는 δ 143.53(CH), 136.13(C), 131.25(C), 120.66(C), 112.49(CH), 105.45(C)로 생각되었다. 또한 동일한 방법으로 이 benzene에 위치한 수소는 δ 7.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)와 6.54(1H, d, $J = 2.0$ Hz)로 지정되었다. 이 둘 두 수소 사이의 coupling constant가 2.0 Hz에 불과한 것은 전형적인 meta 치환을 나타낸 것으로 해석

되었다. 이 사실과 HMBC 자료를 종합하여 이 aromatic ring에서의 치환형태를 완전히 알아내었으며 NMR 상에서의 chemical shifts의 계산에 의하여 각각의 위치의 작용기도 예측이 가능하였다. Database 조사에 의하면 모든 알려진 bromotyrosine-derived alkaloids는 부분구조로서 3-bromo-4-hydroxybenzene을 갖고 있는데 비하여 psammaplins D에서는 작용기의 수와 치환형태가 기존의 천연물과는 많은 차이를 나타내었으므로 신물질임이 분명하였다. 이 천연물의 완전한 구조와 생리활성은 차후에 투고될 논문에 상세히 기술될 것이다.

3. Biphenyl alkaloids의 분리 및 구조 결정

Psammaplins와 함께 신물질인 aplysinellin A(VJP-3-D)와 B(VJP-3-F)가 짙은 갈색의 고체 형태로 분리되었다. 이들의 NMR 자료는 psammaplins와는 여러 가지 면에서 큰 차이를 보여주었다. ^{13}C NMR spectrum에서 새로운 carbonyl carbon이 $\sim \delta 180$ 에 나타났으며 aromatic carbons도 훨씬 많아져 20 여 개의 signals가 발견되었다. 또한 upfield methylenes도 증가하여 각각 8 개씩 나타났다. 상응하는 변화가 ^1H NMR spectrum에서도 관찰되어 aromatic과 aliphatic region 모두가 훨씬 복잡하게 변화하였다. 1D NMR 자료를 면밀히 조사하고 다른 psammaplins와도 비교해 본 결과 이들은 최소한 3 units의 bromotyrosine 유도체로 형성되어 있으며 작용기의 위치와 종류에 있어서 다른 천연물과는 큰 차이를 보임을 알 수 있었다.

그러나 ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 일반적인 2D NMR 방법으로는 aromatic region에 너무나 많은 탄소가 서로 근접해 있는 이들의 구조를 정확히 알 수가 없어서 부득이하게 이들 실험의 결과에 ^{15}N NMR, N-DEPT, N-H COSY, HSQC, gHMBC, NOESY, ^1H -selective INEPT, SIMBA, HMQC-TOCSY 등 새로운 기법의 다차원 NMR 실험 결과를 종합하여 구조를 결정하였다. 고해상 질량분석 자료에 의한 구조의 검증과 생리활성 검색이 완료되지 않았으므로 현 단계에서 자세한 구조를 밝힐 수는 없으나 구조적 특징만 간략하게 살펴보면 먼저 이들 두 천연물은 각각 세 units의 bromotyrosines로 이루어져 있으며 세 번째 unit는 그 형태가 완전히 다르며 main chain에의 결합방식이 다른 두 units의 S-S bond와는 달리 C-C bond를 이루고 있으며 그 결과 해양천연물에서는 발견된 바가 없는 hexa-substituted biphenyl기를 형성하고 있었다. 두 물질의 구조적인 차이는 aplysinellin A에 있어서는 세 번째 bromotyrosine의 C-9 탄소가 free amide로 되어 있는데 비하여 aplysinellin B의 경우는 이 탄소가 다른 bromotyrosine의 benzene ring의 C-3 amine과 결합하여 cyclic amide를 형성한 고리형태로 되어있다. Aplysinellins A와 B는 모두 기존의 해양생물 유래 bromotyrosine alkaloids와는 그 형태의 상이점이 매우 커서 신물질로서의 가치가 매우 높은 것으로 생각된다. 이들의 완전한 구조와 생리활성은 차후에 투고될 논문에서 밝힐 예정이다.

4. 실험방법

가. 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 flash chromatography

청녹색의 해면 *Aplysinella rhax*(시료 번호 VJP-2)는 '96년 8월에 미국령 Guam의 Sponge Mound라고 불리는 지역의 수심 20-30 m에서 SCUBA다이빙에 의하여 채집되었다. 또한 동일한 시료는 '97년 1월 Pohnpei섬 면안의 수심 25-30 m에서도 채집되었다(시료 번호 VJP-3). 이 둘 시료의 형태학적 특성은 문헌상에 보고된 *A. rhax*와 유사하였으며 분류전문가에 의한 미세형태의 분석 결과도 type species와 완전히 일치하였다(Kelley-Borges, personal commun.). 따라서 두 가지 시료를 합하여 화학적 분석과 천연물의 분리를 시도하였다.

채집한 시료는 현장에서 즉시 dry ice로 냉동시킨 후 이 상태에서 Mangilao에 위치한 Guam 대학교 Marine Laboratory로 이동되어 냉동고(-25°C)에 보관되었다. 꺼낸 시료를 freeze-drier로 동결 건조시킨 후 이 시료를 해양연구소로 항공 운송하였다. 건조된 시료(중량 153.3 g)를 비이커에 넣고 methanol(2 L x 3)과 dichloromethane(2 L x 2)을 순차적으로 가하여 유기물질을 추출하였다. 용매를 증발시킨 후에 잔류물을 합한 조추출물(97.6 g)에 대하여 물(1 L x 1)과 n-butanol(1 L x 3)의 분획을 이용하여 소금과 기타의 수용성 염을 제거하였다. 짙은 청녹색을 띤 물층(63.98 g)은 감압 증류하여 용매를 제거한 뒤 methanol(500 mL x 2)로 재추출하였다. 그러나 이 층에 대한 ¹H NMR 분석 결과 지방산과 기타의 일차대사물질만 존재하는 것으로 드러나 폐기하였다.

짙은 적갈색을 띤 butanol층(24.97 g)은 용매를 감압 증류한 뒤 다시 n-hexane(1 L x 2)과 15% aqueous methanol(1.5 L x 2)의 분획을 이용하여 극성에 따른 분리를 하였다(n-hexane: 7.29 g, aqueous methanol: 17.67 g). 생리활성 측정결과 aqueous methanol층이 brine-shrimp larvae에 대한 강한 활성(LD₅₀ 28.3 ppm)을 나타내었다. Aqueous methanol층에 용해된 물질을 취하여 methanol을 이용하여 ODS silica에 흡착시킨 후 reversed-phase vacuum flash chromatography(5 cm x 5 cm, YMC ODS-A 60-125 gel 400 mesh)를 하였다. 용출한 용매는 methanol과 물의 혼합액으로서 50% aqueous methanol로부터 시작하여 100% methanol에 이르기까지 10% gradient system을 이용하였다. 500 mL 씩 용출한 각각의 분액을 감압 건조한 뒤 중량과 ¹H NMR을 측정하였으며 brine-shrimp에 대한 독성도 함께 측정하였다. 이 결과 50-20% aqueous methanol로 용출한 분액에 매우 폭넓게 천연물이 함유되어 있음을 확인하였다.

나. 천연물의 분리

Reversed-phase flash chromatography에서 50% aqueous MeOH로 용출한 분액에 대해

여 저온 감압건조를 하여 용매를 제거 하였다 . 남은 고체물질(2.20 g)을 모두 취하여 60% aqueous MeOH에 녹인 뒤 SPARTAN filter를 사용하여 불용성 물질을 제거하였다. 남은 용액을 C₁₈ reversed-phase HPLC(60% aq. methanol, YMC-ODS-A column, 1 cm x 25 cm, Shodex RI detector, 2.0 mL/min)를 한 결과 retention time 7.5, 7.7, 7.9, 9.3, 29 min 에서 천연물 VJP-3-F, -C, -C1, -D 및 -B가 각각 분리되었다. 동일한 HPLC에서 분리 용매만 달리하여 정제를 한 결과 물질 VJP-3-B, -C, -C1, -D 및 -F가 각각 513.3, 23.1, 16.0, 24.6, 16.2 mg 얻어졌다: elution solvents, 90% aq. MeCN for VJP-3-F and -C; 80% aq. MeCN for VJP-3-C1 and -D; 60% aq. MeCN for VJP-3-B, respectively.

Flash chromatography에서 30% aqueous MeOH로 용출한 분액에 대하여는 동일한 방법으로 고체물질(4.63 g)을 취하여 C₁₈ reversed-phase HPLC(40% aq. MeOH, Shiseido Capcell column, 1 cm x 25 cm, Shodex RI detector, 1.5 mL/min)로 분리한 결과 retention time 7.6과 21.8 min에서 주대사물질인 VJP-3-B(1,206 mg)와 -A(1,385 mg)가 각각 분리되었다. 미량물질인 VJP-3-A1(4.8 mg)은 retention time 19.6 min에서 분리되었다. 또한 vacuum flash chromatography에서 20% aqueous MeOH로 용출한 분액(0.73 g)에 대하여 동일한 HPLC(35% aq. MeOH, YMC Pro-C₁₈ column, 1 cm x 25 cm, 1.4 mL/min) 과정을 거쳐 retention time 15.3과 25.1 min에서 VJP-3-A(147.3 mg)와 -E(187.6 mg)가 각각 분리되었다.

Psannaplin A (VJP-3-A) - a yellow solid; ¹H NMR(CD₃OD) δ 7.37 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2, -2'), 7.06 (2H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H-6, -6'), 6.73 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5, -5'), 3.78 (4H, s, H-7, -7'), 3.52 (4H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10, -10'), 2.79 (4H, t, *J* = 6.8 Hz, H-11, -11'); ¹³C NMR(CD₃OD) δ 165.77 (C, C-9, -9'), 153.65 (C, C-8, -8'), 153.04 (C, C-4, -4'), 134.41 (CH, C-2, -2'), 130.53 (C, C-1, -1'), 130.33 (CH, C-6, -6'), 116.94 (CH, C-3, -3'), 110.43 (C, C-5, -5'), 39.57 (CH₂, C-10, -10'), 38.51 (CH₂, C-11, -11'), 28.69 (CH₂, C-7, -7'); HMBC correlations H-2(2')/C-3(3'), C-4(4'), C-6(6'), C-7(7'); H-5(5')/C-1(1'), C-3(3'), C-4(4'); H-6(6')/C-2(2'), C-4(4'), C-7(7'); H-7(7')/C-2(2'), C-6(6'), C-8(8'), C-9(9'); H-10(10')/C-9(9'), C-11(11'); H-11(11')/C-10(10'); HRFABMS [M+H]⁺ *m/z* 664.9566 (calculated for C₂₂H₂₅⁷⁹Br⁸¹BrN₄O₆S₂, 664.9562, Δ-0.4 mu).

Psannaplin A1 (VJP-3-A1) - a yellow gum; ¹H NMR(CD₃OD) δ 7.37 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, H-6), 6.73 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 3.88 (2H, s, H-7), 3.59 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-10), 2.63 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-11); ¹³C NMR(CD₃OD) δ 165.77 (C, C-9), 153.65 (C, C-8), 153.04 (C, C-4), 134.47 (CH, C-2), 130.13 (C, C-1), 130.93 (CH, C-6), 116.94 (CH, C-3), 110.43 (C, C-5), 39.14 (CH₂, C-10), 36.59 (CH₂, C-11), 28.15 (CH₂, C-7); HMBC correlations H-2/C-3, C-4, C-6, C-7; H-5/C-1, C-3, C-4; H-6/C-2, C-4, C-7; H-7/C-2, C-6, C-8,

C-9; H-10/C-9, C-11.

Psannaplin B (VJP-3-B) - a yellow solid: ^1H NMR(CD_3OD) δ 7.79 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.41 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5'), 7.36 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.31 (1H, dd, J = 8.8, 2.0 Hz, H-6'), 7.06 (1H, dd, J = 8.3, 2.0 Hz, H-6), 6.75 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5), 3.78 (2H, s, H-7), 3.76 (2H, s, H-7'), 3.51 (4H, t, J = 6.8 Hz, H-10, -10'), 3.02 (3H, s, N-Me), 2.80 (4H, t, J = 6.8 Hz, H-11, -11'); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 165.80 (C, C-9), 165.63 (C, C-9'), 153.65 (C, C-4), 153.03 (C, C-8), 152.54 (C, C-8'), 151.57 (C, C-4'), 135.04 (C, C-1'), 134.62 (CH, C-2'), 134.42 (CH, C-2), 130.55 (C, C-1), 130.32 (CH, C-6), 125.00 (CH, C-6'), 116.98 (CH, C-5), 112.27 (CH, C-5'), 111.48 (C, C-3'), 110.43 (C, C-3), 39.65 (CH_2 , C-10'), 39.58 (CH_2 , C-10), 38.56 (CH_2 , C-11'), 38.48 (CH_2 , C-11), 38.28 (CH_3 , N- CH_3), 28.99 (CH_2 , C-7'), 28.69 (CH_2 , C-7); HMBC correlations H-2/C-3, C-4, C-6, C-7; H-5/C-1, C-3, C-4; H-6/C-2, C-4, C-7; H-7/C-2, C-6, C-8, C-9; H-10/C-9, C-11; H-11/C-10; H-2'/C-1', C-3', C-4', C-6', C-7'; H-5'/C-1', C-3', C-4'; H-6'/C-2', C-4', C-7'; H-7'/C-1', C-2', C-6', C-8', C-9'; H-10'/C-9', C-11'; H-11'/C-10' N-Me/C-12'; HRFABMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 752.0381 (calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{34}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrN}_7\text{O}_6\text{S}_2$, 752.0358, Δ -2.3 mmu).

Psannaplin C (VJP-3-C) - a yellow solid: ^1H NMR(CD_3OD) δ 7.78 (2H, d, J = 2.0 Hz, H-2, -2'), 7.36 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-5, -5'), 7.31 (1H, dd, J = 8.8, 2.0 Hz, H-6, -6'), 3.74 (4H, s, H-7, -7'), 3.41 (4H, t, J = 6.8 Hz, H-10, -10'), 3.05 (6H, s, N-Me), 2.83 (4H, t, J = 6.8 Hz, H-11, -11'); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 165.69 (C, C-9, -9'), 152.24 (C, C-8, -8'), 150.44 (C, C-4, -4'), 135.12 (C, C-1, -1'), 133.52 (CH, C-2, -2'), 125.00 (CH, C-6, -6'), 110.49 (C, C-3, -3'), 110.27 (CH, C-5, -5'), 39.65 (CH_2 , C-10, -10'), 38.59 (CH_2 , C-11, -11'), 38.25 (CH_3 , N- CH_3), 29.01 (CH_2 , C-7, -7'); HMBC correlations H-2(2')/C-1(1'), C-3(3'), C-4(4'), C-6(6'), C-7(7'); H-5(5')/C-1(1'), C-3(3'), C-4(4'); H-6(6')/C-2(2'), C-4(4'), C-7(7'); H-7(7')/C-1(1'), C-2(2'), C-6(6'), C-8(8'), C-9(9'); H-10(10')/C-9(9'), C-11(11'); H-11(11')/C-10(10'); N-Me/C-12(12').

Psannaplin Cl (VJP-3-Cl) - a yellow oil: ^1H NMR(CD_3OD) δ 7.78 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.36 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.31 (1H, dd, J = 8.8, 2.0 Hz, H-6), 3.74 (2H, s, H-7), 3.71 (2H, br t, J = 6.8 Hz, H-10), 3.05 (3H, s, N-Me), 2.63 (2H, br t, J = 6.8 Hz, H-11); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 165.69 (C, C-9), 152.24 (C, C-8), 150.44 (C, C-4), 135.12 (C, C-1), 133.52 (CH, C-2), 125.00 (CH, C-6), 110.49 (C, C-3), 110.27 (CH, C-5), 39.12 (CH_2 , C-10), 38.25 (CH_3 , N- CH_3), 36.57 (CH_2 , C-11), 29.01 (CH_2 , C-7).

Psannaplin D (VJP-3-E) - a yellow solid: ^1H NMR(CD_3OD) δ 7.36 (1H, d, J =

2.0 Hz, H-2), 7.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.06 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6), 6.75 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 3.94 (2H, s, H-7'), 3.78 (2H, s, H-7), 3.51 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-10/-10'), 3.49 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-10/-10'), 2.80 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-11/-11'), 2.77 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-11/-11'); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 165.84 (C, C-9'), 165.78 (C, C-9), 153.62 (C, C-4), 153.07 (C, C-8/-8'), 153.03 (C, C-8/-8'), 143.53 (CH), 136.13 (C), 134.43 (CH, C-2), 131.25 (C), 130.57 (C, C-1), 130.36 (CH, C-6), 120.66 (C), 116.98 (CH, C-5), 112.49 (CH), 110.46 (C, C-3), 105.45 (C), 39.63 (CH_2 , C-10/-10'), 39.58 (CH_2 , C-10/-10'), 38.50 ($\text{CH}_2 \times 2$, C-11, -11'), 28.71 (CH_2 , C-7), 26.71 (CH_2 , C-7'); HMBC correlations H-2/C-1, C-3, C-4, C-7; H-5/C-3, C-4, C-6; H-6/C-2, C-4, C-7; H-7/C-1, C-6, C-8, C-9; H-10(10')/C-9(9'), C-11(11'); H-11(11')/C-10(10'); H-7'/C-8', C-9'.

Aplysinellin A (VJP-3-D) - a dark brown solid: ^1H NMR(CD_3OD) δ 8.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.11 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.96 (1H, s), 6.81 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 3.97 (4H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.72 (2H, s), 3.68 (2H, br s), 3.51 (2H, br s), 3.13 (2H, t, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 179.36 (C), 166.21 (C), 165.44 (C), 153.08 (C), 152.90 (C), 151.22 (C), 150.43 (C), 146.81 (C), 143.67 (C), 141.25 (CH), 135.65 (CH), 135.47 (C), 134.56 (CH), 134.50 (C), 134.06 (CH), 130.28 (C), 128.44 (C), 127.46 (C), 126.33 (CH), 120.89 (CH), 121.57 (C), 118.69 (C), 115.01 (CH), 110.47 (C), 93.09 (C), 41.05 (CH_2), 40.00 (CH_2), 39.56 (CH_2), 38.38 (CH_2), 38.34 (CH_2), 28.72 (CH_2).

Aplysinellin B (VJP-3-F) - a dark brown solid: ^1H NMR(CD_3OD) δ 8.22 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.31 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.15 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.03 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz), 6.93 (1H, s), 6.37 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.21 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.86 (2H, s), 3.77 (2H, s), 3.49 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.78 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.32 (2H, t, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 179.70 (C), 166.10 (C), 165.85 (C), 165.03 (C), 160.23 (C), 154.25 (C), 153.77 (C), 153.00 (C), 144.21 (CH), 142.51 (C), 134.35 (CH), 134.31 (CH), 133.19 (CH), 132.19 (CH), 131.67 (C), 130.83 (C), 130.26 (CH), 129.98 (C), 127.91 (C), 117.28 (CH), 116.37 (C), 114.58 (C), 112.51 (CH), 110.78 (C), 99.09 (C), 39.70 (CH_2), 39.60 (CH_2), 38.67 (CH_2), 38.51 (CH_2), 38.44 (CH_2), 28.96 (CH_2).

File: 9289806 Ident: I_12 Mer Def 0.25 Acq: 28-SEP-1998 10:46:07 +1:19 Cal: 9289801_1
ZAD SE4F FAB+ Magnet BpM: 154 BpI: 1935368 TIC: 29780146 Flags: NORM
File Text: Shin (KORDI) VJP-3-A DMK/NBA

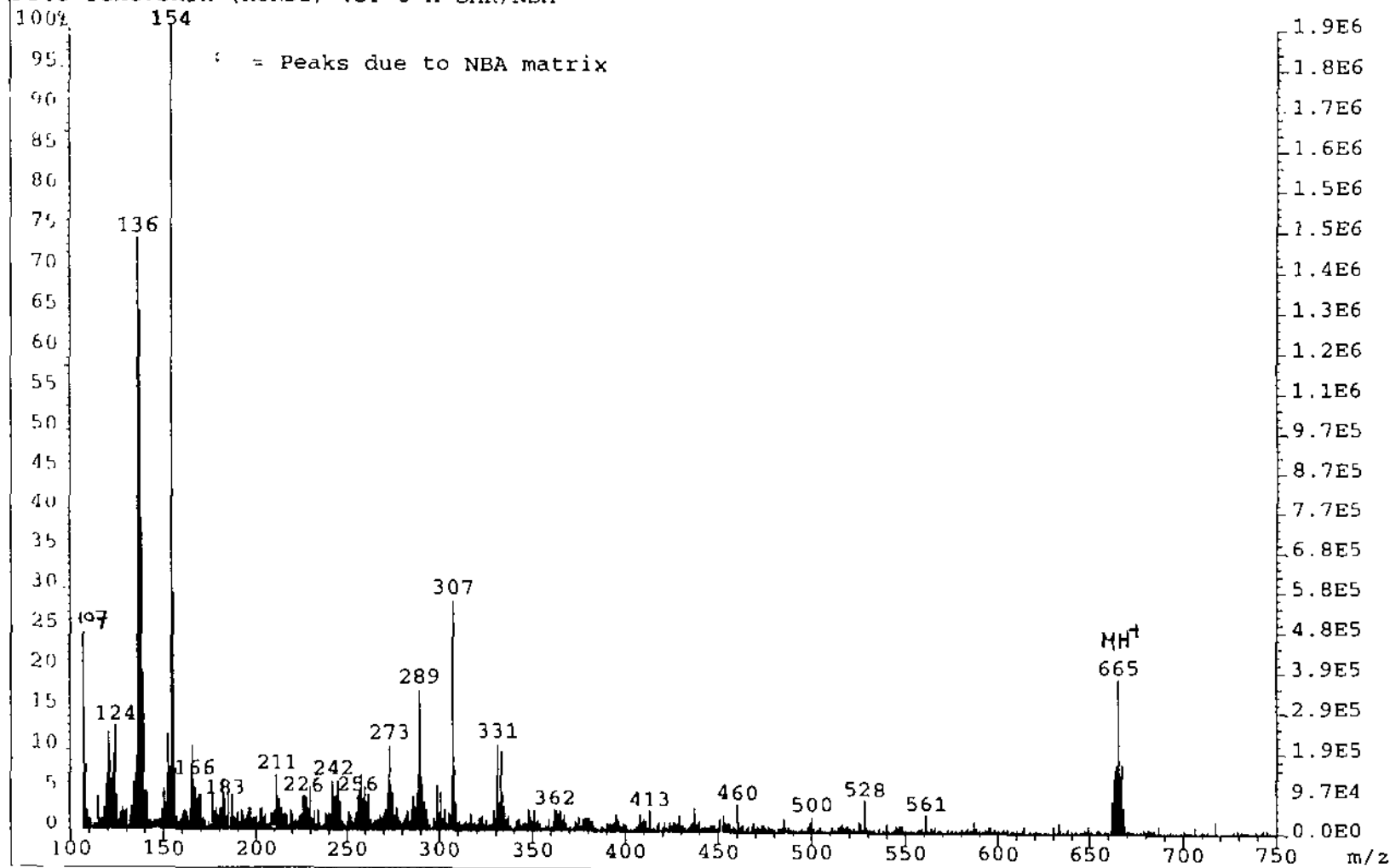


Fig. 3-154. HRFABMS spectrum of psammoplina A (VJP-3-A).

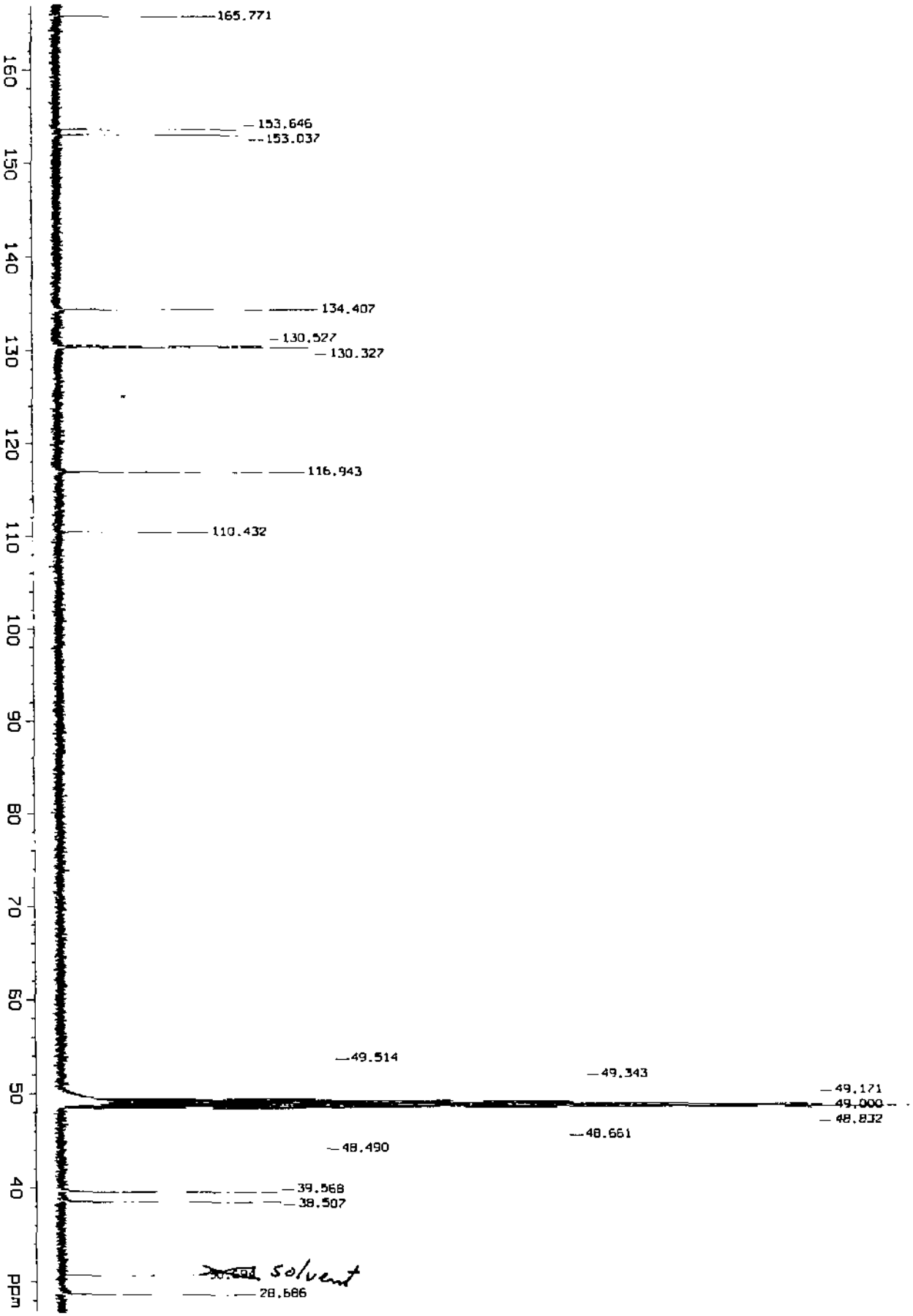


Fig. 3-155. Carbon NMR spectrum of psammaplina A (VJP-3-A).

VJP-3-rfc2-rp8-p

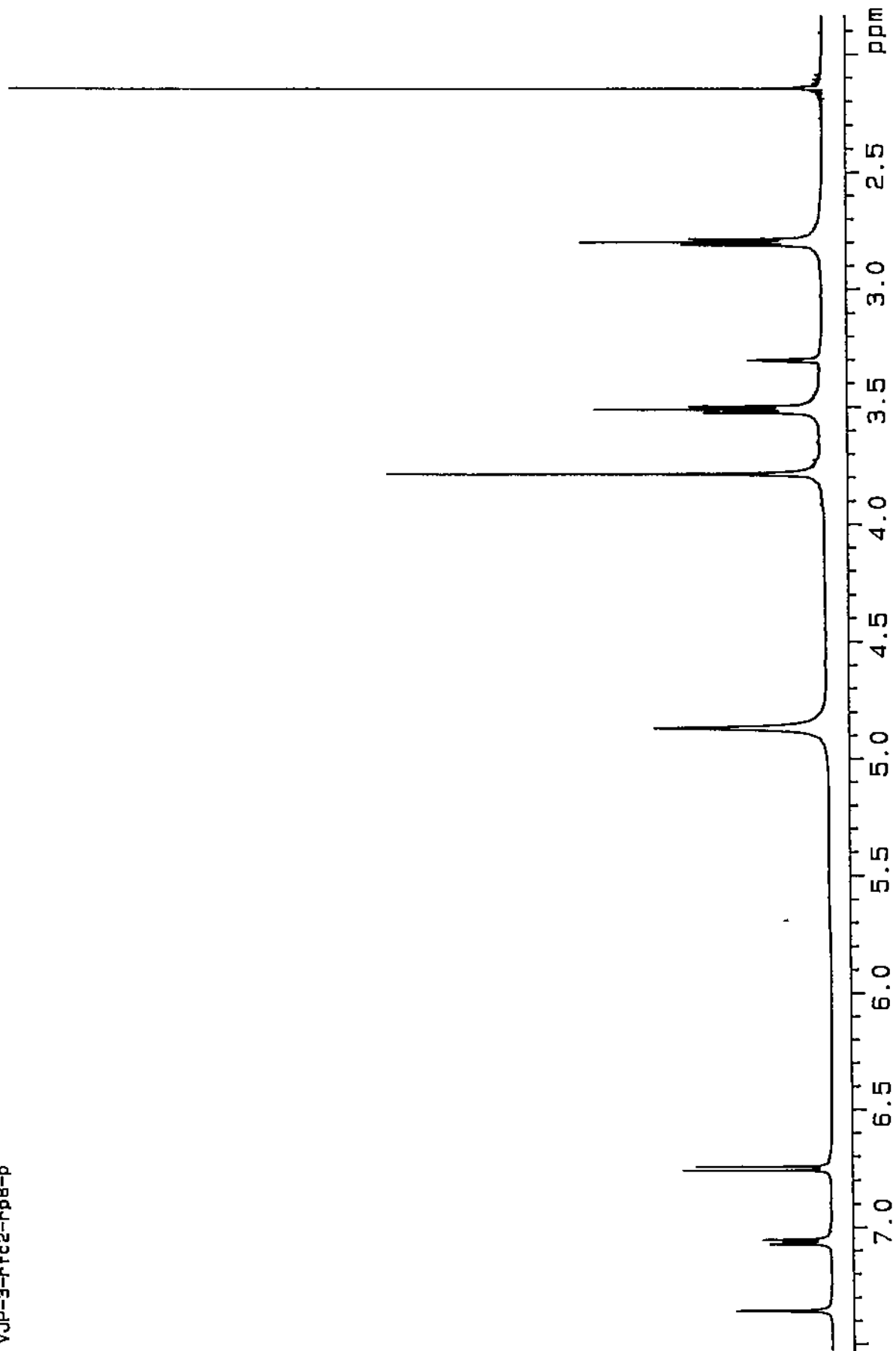


Fig. 3-156. Proton NMR spectrum of psammaphin A (VJP-3-A).

File: 9289809 Ident: 5_25 SMO(1,7) PKD(7,4,7,0.50%,0.0,0.00%,F,F) SPEC(Heights, Centroid) Acq: 28-S*
ZAB-SE4F FAB+ Voltage BpI: 15797696 TIC: 1776789248 Flags: NORM
File Text: Shin (KORDI) VJP-3-B DMK/NBA

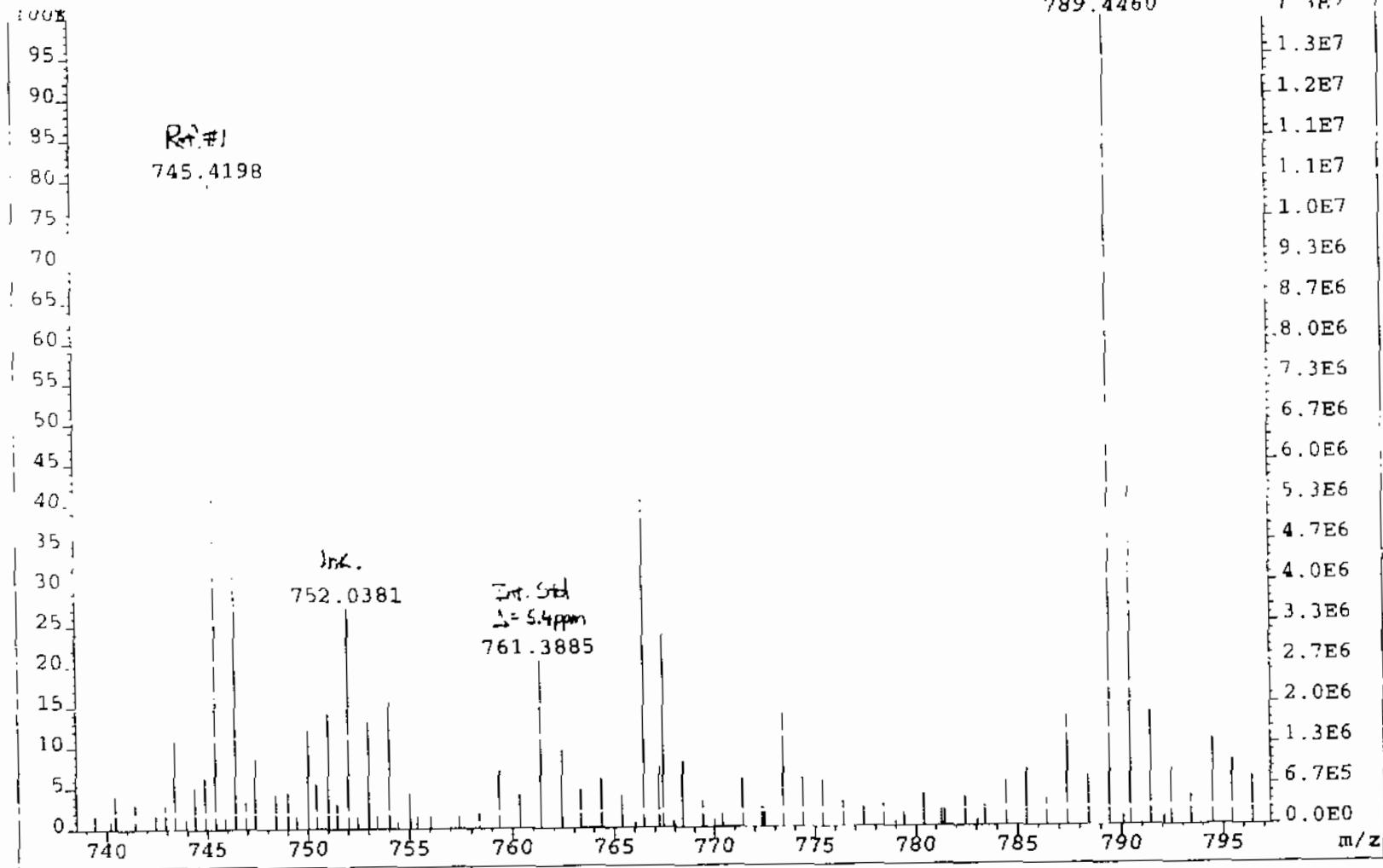


Fig. 3-157. HRFAB/MS spectrum of psammapiin A (VJP-3-A).

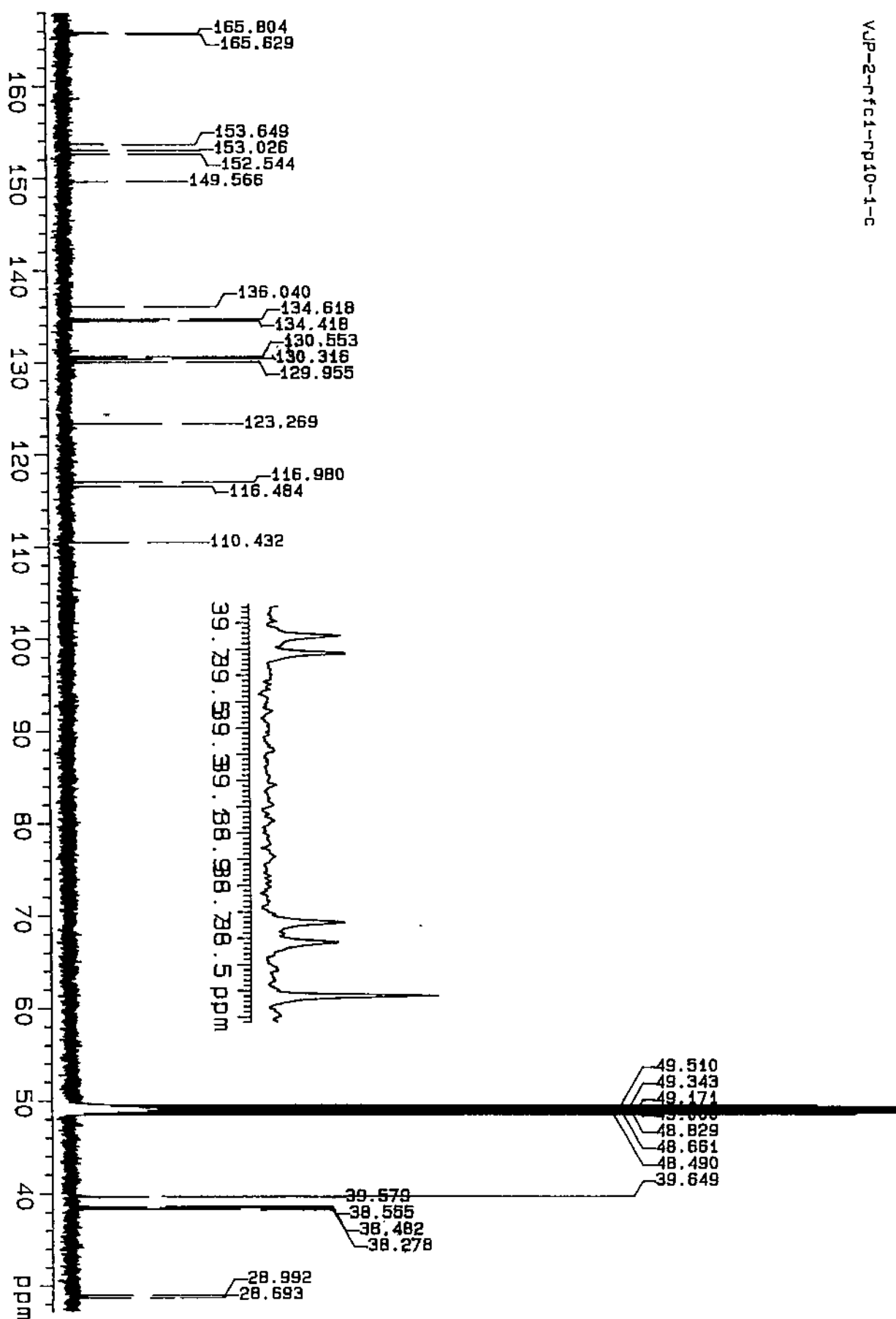


Fig. 3-158. Carbon NMR spectrum of psammalin B(VJP-3-B).

VJP-2-rfc1-rp10-1-p

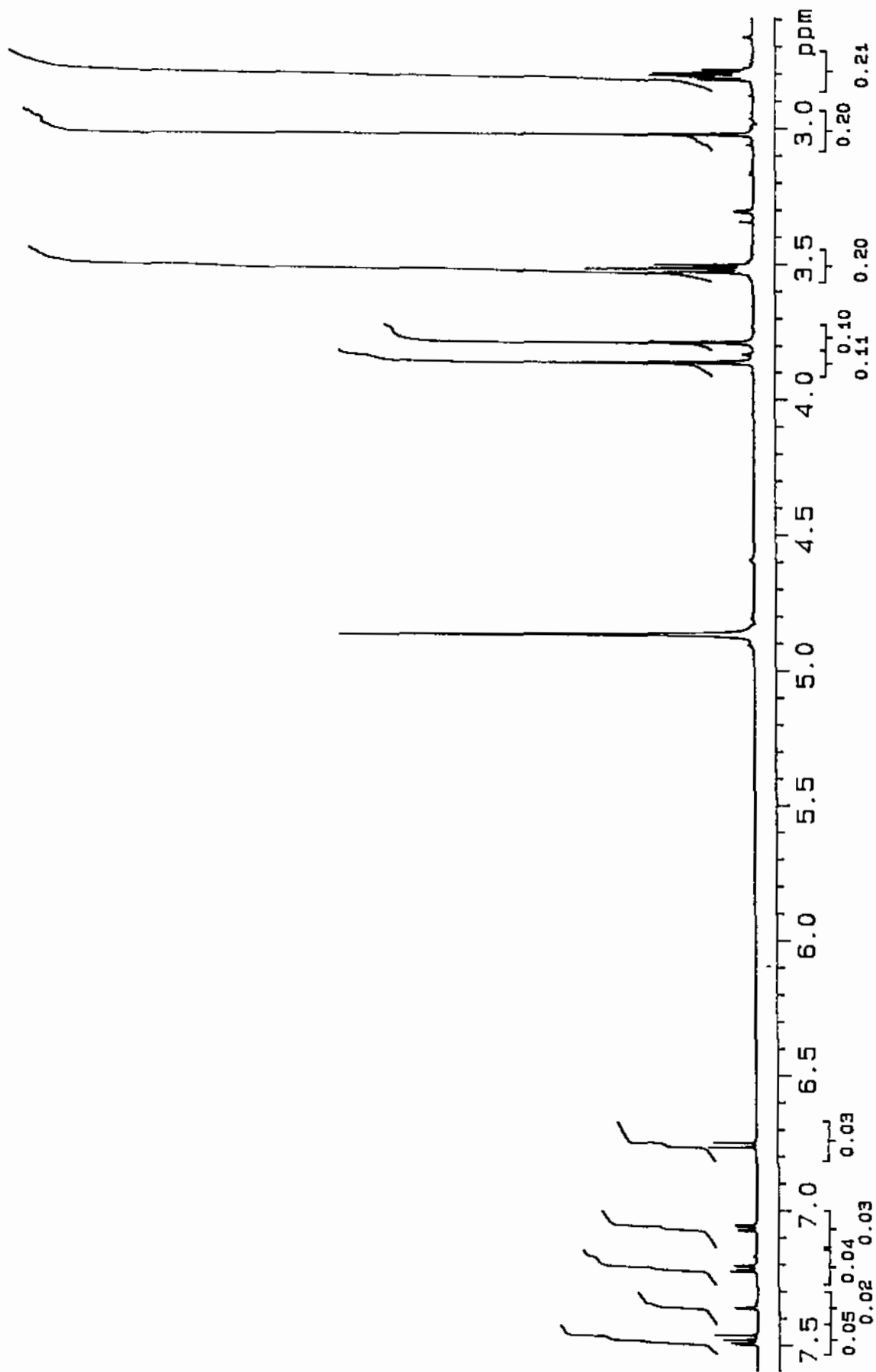


Fig. 3-159. Proton NMR spectrum of psammaplin B(VJP-3-B).

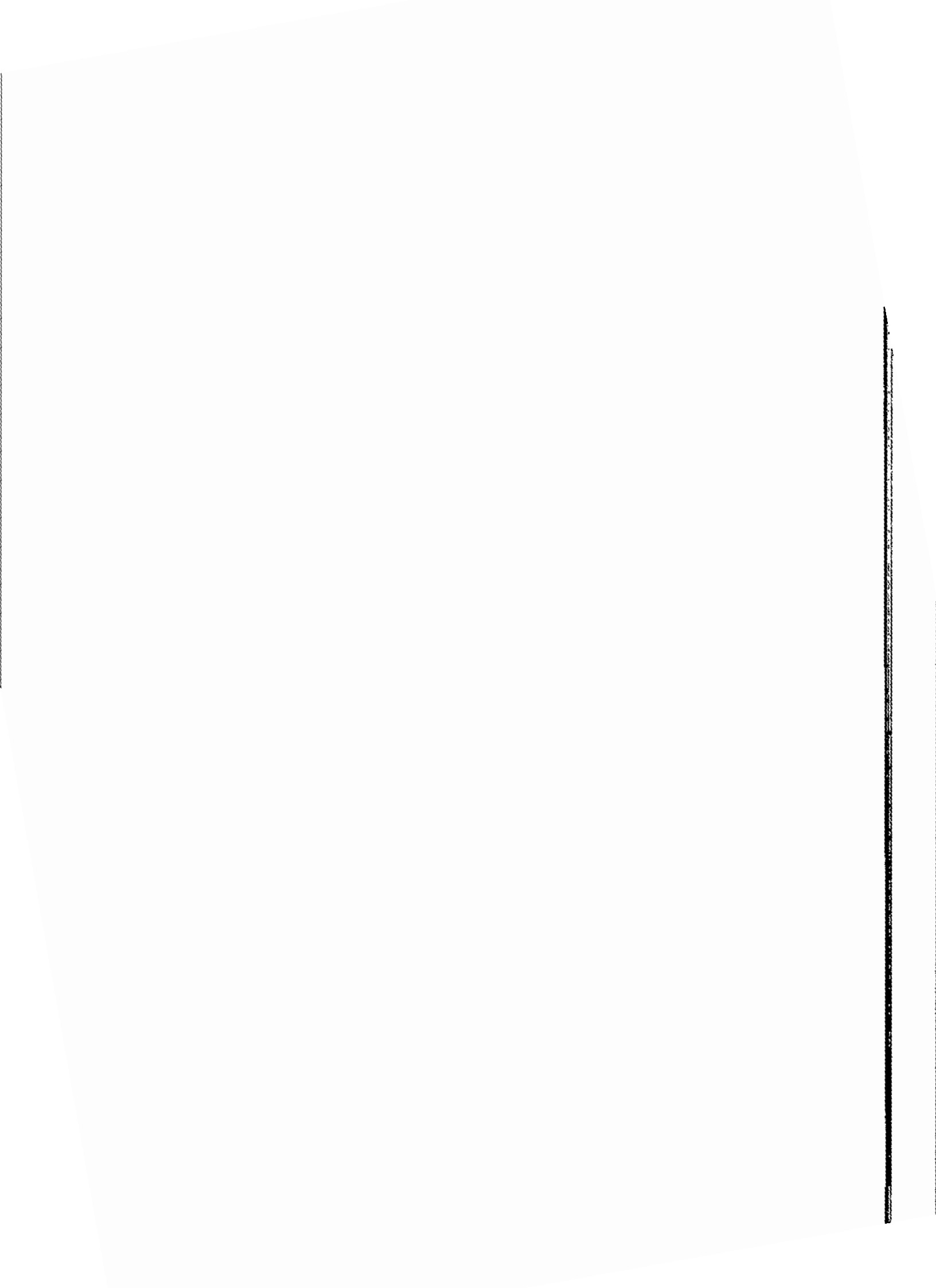
제 8 절 결 론

지난 30여년간 해양천연물에 대한 연구는 눈부시게 발전하여 왔다. 신물질의 산업화에 있어서는 아직 육상생물유래 천연물에 비할 바가 못되나 학문적인 측면에서는 오히려 이들을 능가하고 있는 것이 현재의 실정이다 (Attaway & Zaborsky, 1993; Faulkner, 1997). 해양천연물 연구의 여러 대상 생물중 해면동물은 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. 단순히 화학구조상으로 새로운 물질의 출현빈도 뿐만아니라 천연물의 생리활성의 다양함이나 강도에 있어서도 여타의 해양생물을 압도하고 있다. 따라서 현재 전세계적으로 해양천연물이나 이를 기초로 하는 생화학, 유기화학, 의·약학 및 생태학 연구진에서는 해면동물을 가장 중요한 연구대상 생물로 하고 있다.

해면동물은 전세계적으로 거의 모든 해역에 걸쳐 분포하고 있으며 우리나라 근해에서도 가장 번성하는 저서군체동물 중의 하나이다. 그러나 관련 산·학계의 인식의 부족으로 국내에서의 해면동물의 대사물질에 대한 연구는 거의 시도되지 않고 있는 실정이다. 날로 증가하고 있는 생명과학의 중요성과 점차 심화되고 있는 국가간의 생물자원 확보를 위한 경쟁을 고려할 때 해면의 생리활성물질에 대한 연구는 대단히 시급한 분야이다.

주천연구원 지원사업인 본 '해면동물로부터 생리활성물질 추출연구'는 천연물을 분리하여 구조를 결정하고 다양한 생리활성을 측정하여 산업적 이용 가능성이 높은 물질을 제시하는 것을 목표로 하고 있다. 이를 위해서 우리 나라 남해안(67 종 415 kg)과 열대 태평양에 위치한 Guam 근해(18 종 15 kg)에 서식하는 해면동물을 다수 채집하였으며 조주출물에 대한 생리활성과 화학적 분석에 의하여 연구대상 시료 21종을 선정하였다. 이들 중에서 시료의 양이 충분하다고 판단된 6 종의 시료에 대하여 집중적인 천연물 연구를 수행하였으며 그 결과 29 종의 신물질을 포함하는 42 종의 천연물을 분리하여 구조를 결정하였으며 다양한 생리활성을 측정하였다. 신물질들은 구조적으로 매우 다양하여 sesquiterpenoids, epidioxy steroids, C₃₀ polyacetylenes, linear acetylenic glyceryl ethers, bis(indole)imidazoles, bisguanidinium alkaloids, indolizidine alkaloids, bromotyrosine-derived alkaloids, biphenylic alkaloids 등 여러 생합성적 기원을 가진 물질들이 망라되어 있다. 또한 생리활성 측정 결과 이들중 상당수가 세포독성 항진균 및 효소저해 활성을 갖고 있음을 확인하였다. 이러한 본 연구의 결과는 국내의 해양천연물 연구의 수준을 대폭 향상시킨 것으로 생각되며 향후의 지속적인 노력에 의하여 신물질 개발연구에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도



제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

외국에서의 해양천연물의 연구에 대한 역사는 30년 이상을 헤아린다. 이미 10,000 이상의 천연물이 보고된 바 있고 거의 모든 해양생물이 연구의 대상이었거나 현재도 연구가 활발히 진행되고 있어서 생물의 분류군 별로 천연물의 종류나 추출빈도 등에 대해서도 윤곽이 상당부분 드러나 있다. 해면동물의 천연물은 물질의 추출빈도에 있어서 여타의 모든 해양생물을 압도할 정도로 빈번히 보고되나 그 화학적 구조의 복잡 다양함과 분리정제의 어려움으로 인하여 해양천연물 중에서 상당히 고난이도의 부류에 속하는 것으로 알려져 있다(Faulkner, 1996; 1997). 따라서 해면동물의 천연물을 체계적으로 연구하기 위해서는 천연물 연구의 제반 기술 수준이 상당한 경지에 도달해야 한다는 것은 해양천연물 연구진 사이에서는 널리 알려져 있다. 반면에 국내의 해양천연물 연구의 전반적인 수준은 선진국에 비하여 대단히 미미한 수준에 머물러 있고 천연물 연구를 뒷받침할 해양생물·생태학적 자료도 충분치 못한 실정이다.

이러한 배경 속에서 시작된 본 연구의 최종목표는 해면동물로부터 천연물을 추출하여 구조와 생리활성을 규명하고 산업적 이용방안을 탐색하는 것이다. 정량적인 면에서 당초의 목표는 3년의 기간에 20 종의 신물질을 목표로 하였으며 시료의 채집장소는 우리나라 근해와 열대 지역 및 남극연안을 선정하였다. 생리활성은 항미생물, 세포독성, 항산화활성, DNA와 RNA 분해 등을 자체적으로 측정하고 항바이러스와 항암(*in vivo*) 활성은 외부의 전문기관에 의뢰하는 것이 당초의 계획이었다.

제 3차 년도가 종료한 현 시점에서의 연구성과를 자체적으로 평가하면 당초의 연구 목표를 대부분 성공적으로 달성한 것으로 생각된다. 채집된 시료로부터 획득한 조 추출물에 대한 화학적 분석과 생리활성에 근거하여 중점연구대상으로 선정된 6 종의 시료로부터 29 종의 신물질을 포함하는 42 종의 천연물을 분리정제 하였으며 이들 중에서 38 종의 물질에 대해서는 구조의 결정을 완료하였고 기타 4 종의 신물질에 대해서는 분광학적 방법에 의한 구조결정을 자체적으로 완료한 상태에서 최신 기법을 이용한 고해상 질량분석 자료(국외 전문기관에 의뢰)에 의한 구조의 검증은 기다리고 있다. 본 연구에서 구조가 규명된 신물질들은 구조적인 측면에서도 매우 다양하여 sesquiterpenoids, epidioxy steroids, C₃₀ polyacetylenes, linear acetylenic glyceryl ethers, bis(indole)imidazoles, indolizidine alkaloids, bromotyrosine-derived alkaloids, biphenylic alkaloids 등 다양한 생합성적 기원을 가진 물질들이 망라되어 있다.

생리활성 측정에 있어서 본 연구기간에 자체적으로 여러 종류의 효소(PLA₂, Na⁺/K⁺-ATPase, RT, TOPD-1)에 대한 저해활성의 검색체계를 구축하였다. 천연물에 대한 활성 측정 결과 25 종 이상의 천연물이 생리활성 효과가 있음을 확인하였으며 수 종의 활성물질은 현재 외국의 전문기관에서 정밀 생리활성과 기작에 대한 연구가 진행 중이다. 특히 우리나라 연안에서 채집된 *Petrosia*속으로부터 분리된 petrosiacetylenes은 기존의

생리활성물질과 상이한 작용기를 갖고 있으며 강력한 세포독성과 RNA 분해(cleavage) 효과를 나타내었으므로 현재 화학적 방법에 의한 천연물의 대량생산 및 유도체의 합성이 계획 중이다. 따라서 본 연구과제는 당초 설정하였던 목표를 대부분 충실히 달성한 것으로 생각된다.

연구가 미진하였던 부분과 그 사유는 다음과 같다. 당초의 연구계획에서는 해면시료의 채집지역으로 남극의 연안을 포함시켰다. 그러나 제 1차 년도에 20 여종의 시료를 획득하였으나 지역적 특수성(Austral Summer에만 접근이 가능)과 현장채집의 어려움으로 천연물 연구에 충분한 양의 추가적인 시료획득이 불가능하여 본격적인 연구를 수행할 수 없었다. 생리활성의 측정과 산업적 이용가능성의 탐색부분에 대해서는 당초의 계획에서는 다양한 유도체를 합성하여 천연물과 생리활성을 비교할 생각이었으나 제한된 연구비, 제안서 제출 시점에서는 project base system이 없었음)로 인하여 부득이하게 이 부분을 포기하였다. 이러한 미진한 부분에 대해서는 향후의 관련된 연구과제에서 지속적으로 추구할 예정이다.

본 연구과제의 수행에 의한 대외기여도 측면을 살펴보면 다음과 같다. 먼저 본 연구에 의하여 6 편의 논문을 국내외 전문학술지에 투고하여 5 편이 게재완료 혹은 게재 예정이며 1 편이 심사 중에 있다. 또한 2 편의 논문이 추가적으로 투고될 예정이다.

1. Jongheon Shin*, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, and Chung J. Sim, "Stelletamide B, a new indolizidine alkaloid from a sponge of the genus *Stelletta*", *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 611-613.

2. Youngwan Seo, Jung-Rae Rho, Ki Woong Cho, Chung J. Sim, and Jongheon Shin*, "Isolation of epidioxysteroids from a sponge of the genus *Tethya*", *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1997**, *18*, 631-635.

3. Valerie J. Paul*, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, Jongheon Shin*, and Patricia R. Bergquist, "Sesquiterpenoids of the drimane class from an undescribed sponge of the genus *Dysidea*", *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1115-1120.

4. Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, Jongheon Shin*, and Chung, J. Sim, "Petrocortynes and petrosiacetylenes, novel polyacetylenes from the sponge *Petrosia* sp." *Tetrahedron* **1998**, *54*, 447-462.

5. Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Hyi-Seung Lee, Jung-Rae Rho, and Jongheon Shin*, "New acetylenic enol ethers of glycerol from the sponge *Petrosia* sp.", *J. Nat. Prod.* in press.

6. Jongheon Shin*, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, and Chung J. Sim, "New bisindole alkaloids of the lopsentin class from the sponge *Spongosorites genitrix*", *J. Nat. Prod.*, submitted.

7. Jongheon Shin*, Youngwan Seo, Jung-Rae Rho, Ki Woong Cho, and Valerie J. Paul, "Aplysinellins A and B: Unusual biphenyl alkaloids from the sponge *Aplysinella rhax*", manuscript in preparation (*J. Am. Chem. Soc.*).

8. Jongheon Shin*, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, and Valerie J. Paul*, "Bromotyrosine-derived alkaloids of the psammoplin class from the sponge *Aplysinella rhax*", manuscript in preparation (*Tetrahedron*).

또한 본 연구의 결과를 국내외의 관련학회에서 발표하였으며 그 실적은 다음과 같다.

1. Structure determination of novel steroids isolated from the sponge *Tethya*. 대한화학회 제 78회 총회 (1996. 10. 18-19, 충남대학교).

2. Bromotyrosine-derived metabolites from the sponge *Aplysinella rhax*. 대한화학회 제 79회 총회 (1997. 4. 25-26, 고려대학교).

3. Sesquiterpenoids from a sponge of the genus *Dysidea*. 대한화학회 제 79회 총회 (1997. 4. 25-26, 고려대학교).

4. Metabolites of some coelenterates and sponges of Korean and Tropical waters. 일본해양생물공학회 제 1회 학술대회 초청강연 (1997. 5. 31-6. 1, 일본 동경대학교).

5. New bioactive polyacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia*. The 9th Naito Conference - Chemical and biological basis for the diversity of marine life. (1997. 10. 15-18, 일본 Kanakawa).

6. Petrosiacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia*. 대한화학회 제 81회 총회 (1998. 4. 24-25, 이화여자대학교).

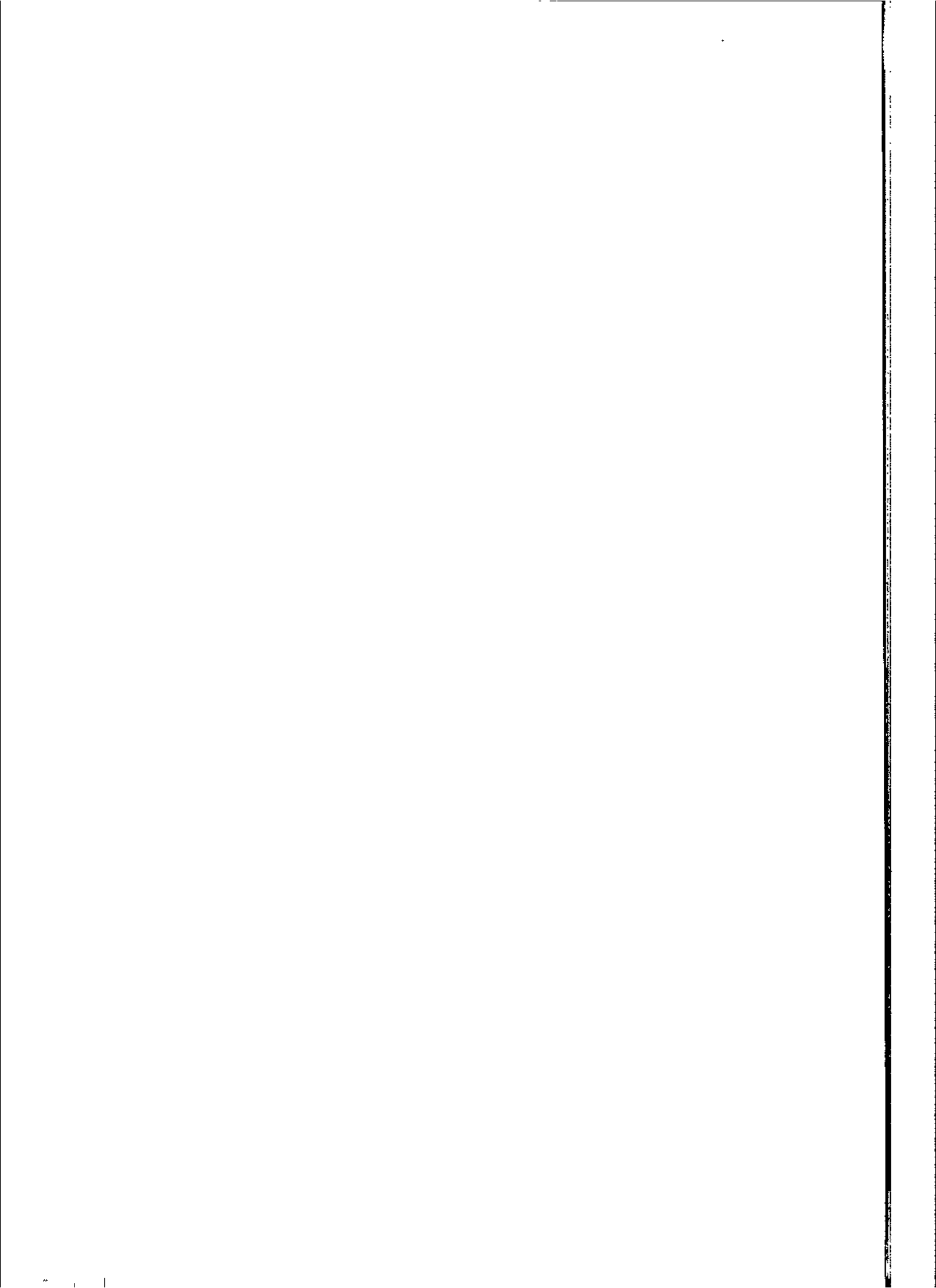
또한 본 연구의 결과로 현재까지 1 건의 특허를 출원하였으며 1 건을 준비중에 있는 바 그 내역은 다음과 같다.

1. 페트로시아세틸렌 (petrosiacetylene) A와 C 및 그 추출방법 (출원번호 97-62420)

2. 아플리지넬린 (aplysinellin) A와 B 및 이를 이용한 항암제 (출원준비 중)

결론적으로 본 연구는 그 동안 국내에서 미약하였던 해양천연물 연구에 있어서 시료의 획득에서 신물질의 생리활성의 측정에 이르는 전 연구과정을 자체적으로 수행하는데 성공하였고 더욱이 국제공동연구를 통하여 열대해역에까지 진출하게 되었다. 특히 신물질 연구의 핵심과정인 천연물의 분리정제와 구조 결정에 있어서는 국제적인 수준에 근접한 것으로 평가된다. 이러한 연구성과는 국내의 신물질 개발노력에 있어서 연구수준의 향상과 연구영역의 확대에 크게 기여한 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획



제 5 장 연구개발결과의 활용계획

해면동물의 천연물에 대한 본 연구를 통하여 생물의 채집, 시료의 분류, 천연물의 분리정제, 신물질의 구조결정, 유도체의 합성, 생리활성의 측정 등 천연물 연구의 제반 과정에 있어서 막대한 발전이 있었다. 특히 신물질 연구의 핵심과정인 물질의 구조 결정에 있어서는 선진국의 수준에 근접한 것으로 생각된다. 또한 기술적인 측면에서 해양 천연물 연구의 -관련분야인 육상천연물 연구에 비하여- 어려운 점의 하나인 불안정하거나 수 μg 이하의 소량으로 존재하는 천연물을 효과적으로 취급하는 문제도 대부분 해결된 것으로 생각된다. 본 연구에 의하여 개발된 이러한 제반기술은 향후의 신물질 개발 및 산업화를 위한 연구에 있어서 요소 기술로 직접 활용될 것이다.

또한 본 연구에 의하여 구조가 결정된 천연물은 다음의 용도에 직접적으로 활용이 가능하다.

1. 생화학, 생리학, 약학, 생물유기화학 등의 연구를 위한 probe로 이용 - 본 연구에 의하여 분리된 수십 종의 천연물 중에서 상당수는 하나 혹은 그 이상의 생리활성을 나타내었다. 따라서 천연물의 생리활성과 관계를 맺고 있는 여러 분야의 기초 및 응용 연구를 위한 수단으로 이용이 가능하다. 본 연구에 의하여 규명된 천연물의 상당수는 이미 관련 연구진에 제공되어 연구의 수단으로 이용이 되고 있다.

2. 신물질 개발을 위한 선도물질로 이용 - 본 연구에서 분리된 물질들의 다수는 구조적으로 새로운 물질들이다. 따라서 이들 중에서 상당수는 천연물 그 자체 혹은 합성 유도체로서 신물질 개발을 위한 선도물질의 역할을 수행할 수 있으며 약화학적 연구에도 활용이 가능하다. 구체적인 예로서 *Spongosorites genitrix*로부터 분리된 topsentins는 외국에서 이미 다수의 특허가 등록되었으며 이들에 기초한 새로운 bisindole alkaloids에 대한 효과적인 대량 합성방법이 개발되고 있다. 또한 *Petrosia* sp.로부터 분리한 petrosiacetylenes에 대해서도 강력한 생리활성을 나타내는 기작이 규명될 경우에는 새로운 항암제의 개발을 위한 선도물질로의 활용 가능성이 충분하다. 특히 본 연구에서 발견된 물질에는 10 여 과정(step)으로 대량생산이 가능하며 작용기의 변환도 용이한 물질들이 다수 포함되어 있으므로 산업적인 신물질 개발을 위한 연구에 활용이 가능할 것이다.

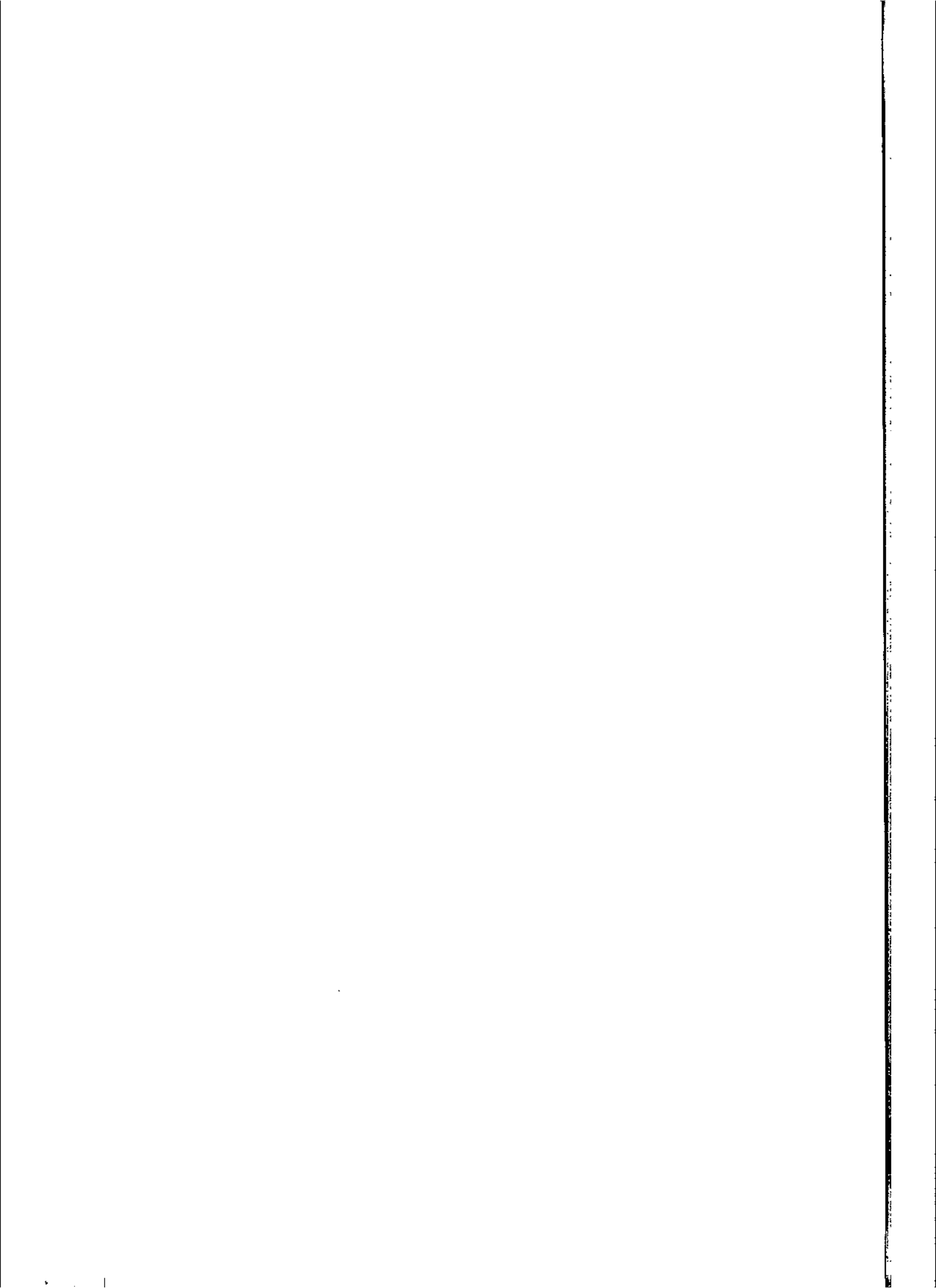
3. 유기화학적 전합성(total synthesis) 및 새로운 합성방법(synthetic methodology)의 개발을 위한 목표로 이용 - 특이한 구조와 강력한 생리활성을 가진 천연물은 유기화학적 제 연구를 위한 목표로 널리 활용되고 있다. 본 연구에서 분리된 모든 천연물에 대해서는 입체구조까지 완벽히 규명되었으므로 전합성의 목표로 활용이 가능하며 이 과정에서 특이한 작용기를 만들기 위한 방법론적 연구에도 기여가 가능하다. 이미 본 연구진에서도 petrosiacetylenes의 유도체에 대한 효과적인 전합성 계획을

수립하여 관련 연구과제에서 수행하고 있는 바이다.

4. 해양생물의 생태학적 연구를 위한 수단으로 이용 - 생태계를 구성하는 각종 생물에 있어서 동종 혹은 이종 생물간의 상관관계는 많은 부분이 천연물에 의하여 조절되고 있다. 특히 포식억제(antifeeding = feeding deterring), 부착억제(antifouling), 변태유도(metamorphosis-inducing) 등은 거의 전부가 천연물에 의한 것이다. 따라서 이러한 화학생태학(chemical ecology)적 제반 연구에 있어서 해당생물의 천연물에 대한 정보와 함께 천연물 그 자체는 필수 불가결한 요소이다. Guam 대학교 해양생물연구진과의 공동 연구도 이러한 맥락에서 시작된 것으로 본 연구진에서는 천연물의 화학 및 의약학적 측면을 담당하고 현지의 연구진은 생태학적 연구를 담당하는 것으로 구성되어 있다. 본 연구진에서는 향후의 관련 연구에서도 우수한 열대해역의 시료에 대한 접근을 위하여 이러한 통로를 지속적으로 활용할 계획이다. 또한 국내의 해양생태학 연구진과 협력하여 우리 나라 근해의 해면에서 추출된 천연물을 이용한 화학생태학적 연구를 계획하고 있다.

요약하여 본 연구과제에서 개발된 여러 단위기술은 향후의 본격적인 해양신물질 개발을 위한 요소기술로 활용될 것이며 분리된 천연물은 관련분야의 기초 및 응용연구를 위한 직접적인 수단으로 활용될 것이다.

제 6 장 참고문헌



제 6 장 참 고 문 헌

- 신종헌, 정지형, 서영완, 백은주, 해양동물의 천연물에 관한 연구 (문헌중심), 한국해양연구소 1993, 417pp.
- 한국해양연구소, 한국근해 저서군체생물로부터 신물질 추출연구, 과학기술처 1994, 340pp.
- Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Pansini, M. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1275-1280.
- Anjaneyulu, A. S. R.; Sagar, K. S.; Venugopal, M. J. R. V. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10997-11010.
- Attaway, D. H.; Zaborsky, O. R. Eds. *Marine Biotechnology*: Plenum Press, New York, 1993, 500pp.
- Avila, C.; Cimino, G.; Crispino, A.; Spinella, A. *Experientia* **1991**, *47*, 306-310.
- Barnes, C. S.; Loder, J. W. *Aust. J. Chem.* **1962**, *15*, 322-327.
- Bartik, K.; Braekman, J. C.; Dalozze, D.; Stoller, C.; Huysecom, J.; Vandevyver, G.; Ottinger, R. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2118-2121.
- Bergquist, P. R.; Wells, R. J. *Chemotaxonomy of the Porifera: The Development and Current Status of the Field*, In *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Scheuer, P. J. Ed. Vol V. Academic Press; New York, **1983**, 1-50.
- Bernart, M. W.; Hallock, Y. F.; Cardellina, Jr., J. H.; Boyd, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 993-994.
- Bewley, C. A.; Holland, N. D.; Faulkner, D. J. *Experientia* **1996**, *52*, 716-722.
- Blackburne, I. D.; Sutherland, M. D. *Aust. J. Chem.* **1972**, *25*, 1779-1786.
- Braekman, J. C.; Dalozze, D.; de Abreu, P. M.; Piccinni-Leopardi, C.; Germain, G.; van Meersche, M. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4277-4280.
- Braekman, J. C.; Dalozze, D.; Defay, N.; Zimmermann, D. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1984**, *93*, 941-949.
- Braekman, J. C.; Dalozze, D.; Moussiaux, B.; Stoller, C.; Denenbourg, F. *Pure & Appl. Chem.* **1989**, *61*, 509-512.

- Braekman, J. C.; Dalozze, D.; Stoller, C. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1987**, *96*, 809-817.
- Breitmaier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy, 3rd edition*, VCH: Weinheim, **1989**, 515pp.
- Butler M. S.; Capon, R. J. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 1255-1267.
- Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587-3590.
- Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13713-13720.
- Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283-2288.
- Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 122-125.
- Caprioli, V.; Cimino, G.; Colle, R.; Gavagnin, M.; Sodano, G.; Spinella, A. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 146-151.
- Carlsen, P. H. J.; Katsuki, T.; Martin, V. S.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3939.
- Cimino, G.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Di Marzo, V. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 345-353.
- Cimino, G.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Di Marzo, V. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3563-3566.
- Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Morrone, R.; Sodano, G. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1093-1100.
- Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2797-2800.
- D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1839-1895.
- Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina, Jr., J. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 88-89.
- Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina, Jr., J. H.; Gray, G. N.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 860-865.
- De Silva E. D.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611-1614.

- Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 75-125, and references cited therein.
- Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 259-302, and references cited therein.
- Fautin, D. G. Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences: San Francisco, **1988**, 159pp.
- FCCSET (Federal Coordinating Council for Sciences, Engineering, and Technology) Committee Report, *Biotechnology for the 21st Century*, U.S. Government Printing Office, 1992, 125pp.
- Fenical, W. *Concluding Remark*, In *Biomedical Importance of Marine Organisms*, Fautin, D. G. Ed., California Academy of Sciences: San Francisco, **1988**, 159.
- Findlay, J. A.; Patil, A. D. *Steroids* **1984**, *44*, 261-265.
- Flam, F. *Science* **1994**, *266*, 1324-1325.
- Fu, X.; Abbas, S. A.; Schmitz, F. J.; Vidavsky, I.; Gross, M. L.; Laney, M.; Schatzman, R. C.; Cabuslay, R. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 799-814.
- Fukuyama, Y.; Sato, T.; Miura, I.; Asakawa, Y. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1521-1524.
- Fusetani, N.; Kato, Y.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2771-2774.
- Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Matsumoto, H.; Takebayashi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053-7057.
- Fusetani, N.; Shiragaki, T.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4313-4314.
- Fusetani, N.; Sugano, M.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4311-4312.
- Garson, M. J.; Dexter, A. F.; Lambert, L. K.; Liokas, V. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 364-367.
- Garson, M. J. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1699-1734.
- Gerhart, D. J. *Biol. Bull.* **1981**, *164*, 71-95.
- Giner, J.-L. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1735-1752.
- Greca, M. D.; Mangoni, L.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtera, L. *Gazz. Chim. Ital.* **1990**, *120*, 391-392.

- Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Chem. Commun.* **1986**, 77-78.
- Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1050-1062.
- Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1400-1411.
- Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1346-1352.
- Gunatilaka, A. A. L.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3860-3866.
- Guo, Y.; Cavagnin, M.; Salierno, C.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 333-337.
- Guo, Y.; Cavagnin, M.; Trivellone, E.; Cimino, G. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13261-13268.
- Guo, Y.; Cavagnin, M.; Trivellone, E.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 712-722.
- Hallock, Y. F.; Cardellina, Jr., J. H.; Balaschak, M. S.; Alexander, M. R.; Prather, T. R.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1995**, *55*, 1801-1807.
- Haslam, E. *Nat. Prod. Rep.* **1986**, *3*, 217-249.
- Hirata Y.; Uemura, D. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-725.
- Hirota, H.; Matsunaga, S.; Fusegani, N. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4163-4164.
- Hoshino, T. *J. Sci. Hiro. Univ. Ser. B. Div. I.* **1981**, *29*, 207-289.
- Iguchi, K.; Kitade, M.; Kashiwagi, T.; Yamada, Y. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5690-5693.
- Iguchi, K.; Shimura, H.; Yang, Z.; Yamada, Y. *Steroids* **1993**, *58*, 410-413.
- Ireland, C. M.; Roll, D. M.; Molinski, T. F.; McKee, T. C.; Zabriskie, T. M.; Swersey, J. C. *Uniqueness of the Marine Chemical Environment: Categories of Marine Natural Products from Invertebrates*, In *Biomedical Importance of Marine Organisms*; Fautin D. G. Ed. California Academy of Sciences: San Francisco. **1988**, 41-59.
- Issacs, S.; Kashman, Y.; Loya, S.; Hizi, A.; Loya, Y. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10435-10438.
- Jackman, L. M.; Sternhell, S. *Application of Nuclear Magnetic Resonance*

Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd ed. Pergamon Press, London, **1969**, 456pp.

Jansen, B. M.; de Groot, A. *Nat. Prod. Rep.* **1991**, *8*, 309-318.

Kalinowski, H.-O.; Berger, S.; Braun, S. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, **1988**, 311pp.

Kawasaki, I.; Yamashita, M.; Ohta, S. *J. Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1831-1839.

Kawasaki, I.; Yamashita, M.; Ohta, S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2085-2086.

Kobayashi, J.; Ishida, K.; Naitoh, K.; Shigemori, H.; Mikami, Y.; Sasaki, T. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1350-1355.

Kobayashi, J.; Suzuki, M.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15681-15684.

Kobayashi, J.; Suzuki, M.; Tsuda, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16679-16682.

Kobayashi, M.; Kawazoe, K.; Kitagawa, I. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4149-4152.

Kobayashi, M.; Mahmud, T.; Tajima, H.; Wang, W.; Aoki, S.; Nakagawa, S.; Mayumi, T.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 720-724.

Kubo, I.; Lee, Y.-W.; Pettei, M.; Pilkiewicz, F.; Nakanishi, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 1013-1014.

Mancini, I.; Guella, G.; Debitus, C.; Waikedre, J.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2075-2082.

Mancini, I.; Guella, G.; Pietra, F.; Amade, P. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2625-2628.

Mancini, I.; Guella, G.; Amade, P.; Roussakis, C.; Pietra, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271-6274.

McConnell, O. J.; Saucy, G.; Jacobs, R. **1992**, U.S. Patent US, 5,290,777 [CA 120:236178].

McConnell, O. J.; Saucy, G.; Jacobs, R.; Gunasekera, S. P. **1994**, U.S. Patent US 5,464,835 [CA 124:76517].

Mirshra, P. D.; Wahidulla, S.; D'Souza, L.; Kamat, S. Y. *Ind. J. Chem. Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1996**, *35B*, 806-809.

Molinski, T. F.; Fahy, E.; Faulkner, D. J.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1340-1346.

Montagnac, A.; Martin, M.-T.; Debitus, C.; Pais, M. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 866-868.

Mori, K.; Watanabe, H. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 273-281.

Morris, S. A.; Andersen, R. J. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 677-681.

Morris, S. A.; Andersen, R. J. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 715-720.

Murray, L. M.; Lim, T. K.; Hooper, J. N. A.; Capon, R. J. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 2053-2058.

Nakanishi, K.; Solomon, P. H. *Infrared Absorption Spectroscopy*, 2nd ed. Holden-Day, San Francisco, **1977**, 287 pp.

Narahashi, T. *Marine Organisms as Models for the Study of Neuropharmacology* In Fautin, D. G. Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences: San Francisco, **1987**, 97-109.

Ochi, M.; Arika, S.; Tatsukawa, A.; Kotsuki, H.; Fukuyama, Y.; Shibata, K. *Chem. Lett.* **1994**, 89-92.

Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.

Ortega, M. J.; Zubia, E.; Carballo, J. L.; Salva, J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1069-1071.

Paul, P. J. *Marine Chemical Ecology and Natural Products Research*. In *Biomedical Importance of Marine Organisms*, Fautin, D. G. Ed. California Academy of Sciences: San Francisco, **1987**, 23-28.

Paul, V. J.; Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Bergquist, P. R. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1115-1120.

Pawlik, J. R. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1911-1922.

Perry, N. B.; Becker, E. G.; Blunt, J. W.; Lake, R. J.; Munro, M. H. G. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 732-734.

Pettit, G. R.; Cichacz, Z. A.; Gao, F.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Schmidt, J. M.; Hooper, J. N. A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1302-1309.

Phife, D. W.; Ramos, R. A.; Feng, M.; King, I.; Gunasekera, S. P.; Wright, A.; Patel, M.; Pachter, J. A.; Coval, S. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2103-2106.

- Quinoa E.; Crews, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3229-3232.
- Raub, M. F.; Cardellina, Jr., J. H.; Spande, T. F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2257-2260.
- Rinehart, K. L. *Screening to Detect Biological Activity*, In *Biomedical Importance of Marine Organisms*, Fautin, D. G. Ed. California Academy of Sciences; San Francisco, **1987**, 13-22.
- Rodriguez, A. D.; Akee, R. K.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4989-4992.
- Sakemi, S.; Sun, H. H. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4304-4307.
- Seo, Y.; Cho, K. W.; Lee, H.-S.; Rho, J.-R.; Shin, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, in press.
- Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Sim, C. J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 447-462.
- Seo, Y.; Rho, J.-R.; Cho, K. W.; Sim, C. J.; Shin, J. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1997**, *18*, 631-635.
- Shin, J. Ph. D. Dissertation, University of California, San Diego, La Jolla, **1989**, 222pp.
- Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K. W. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1268-1273.
- Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Sim, C. J. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 611-613.
- Shin, J.; Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Sim, C. J. *J. Nat. Prod.* **1998**, submitted.
- Shin, J.; Seo, Y.; Rho, J.-R.; Baek, E.; Kwon, B.-M.; Bok, S.-H.; Jung, T.-S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7582-7588.
- Suffness, M.; Thompson, J. E. *National Cancer Institute's Role in the Discovery of New Antineoplastic Agents* In Fautin, D. G. Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*. California Academy of Sciences; San Francisco. **1987**, 151-158.
- Taylor, P.; Culver, P.; Abramson, S.; Wasserman, L.; Kline, T.; Fenical, W. *Use of Selective Toxins to Examine Acetylcholine Receptor Structure* In Fautin, D. G. Ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*. California Academy of Sciences; San Francisco. **1987**, 109-115.
- Thacker, R. W.; Becerro, M. A.; Lumbang, W. A.; Paul, V. *J. Ecology*. **1998**, in

press.

Tsujii, S.; Rinehart, Jr., K. L.; Gunasekera, S. P.; Kashman, Y.; Cross, S. S.;
Lui, A. S.; Pomponi, S. A.; Diaz, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5446-5453.

Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 126-
130.

Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*,
5555-5556.

Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 501-
503.

Uneyama, A.; Nagano, C.; Arihara, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 131-133.

Uno, J.; Ohta, S.; Ohta, E.; Ikegami, S. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1146-1148.

Unson, M. D.; Faulkner, D. J. *Experientia* **1993**, *49*, 349-357.

Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; Van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.*
1981, *103*, 6772-6773.

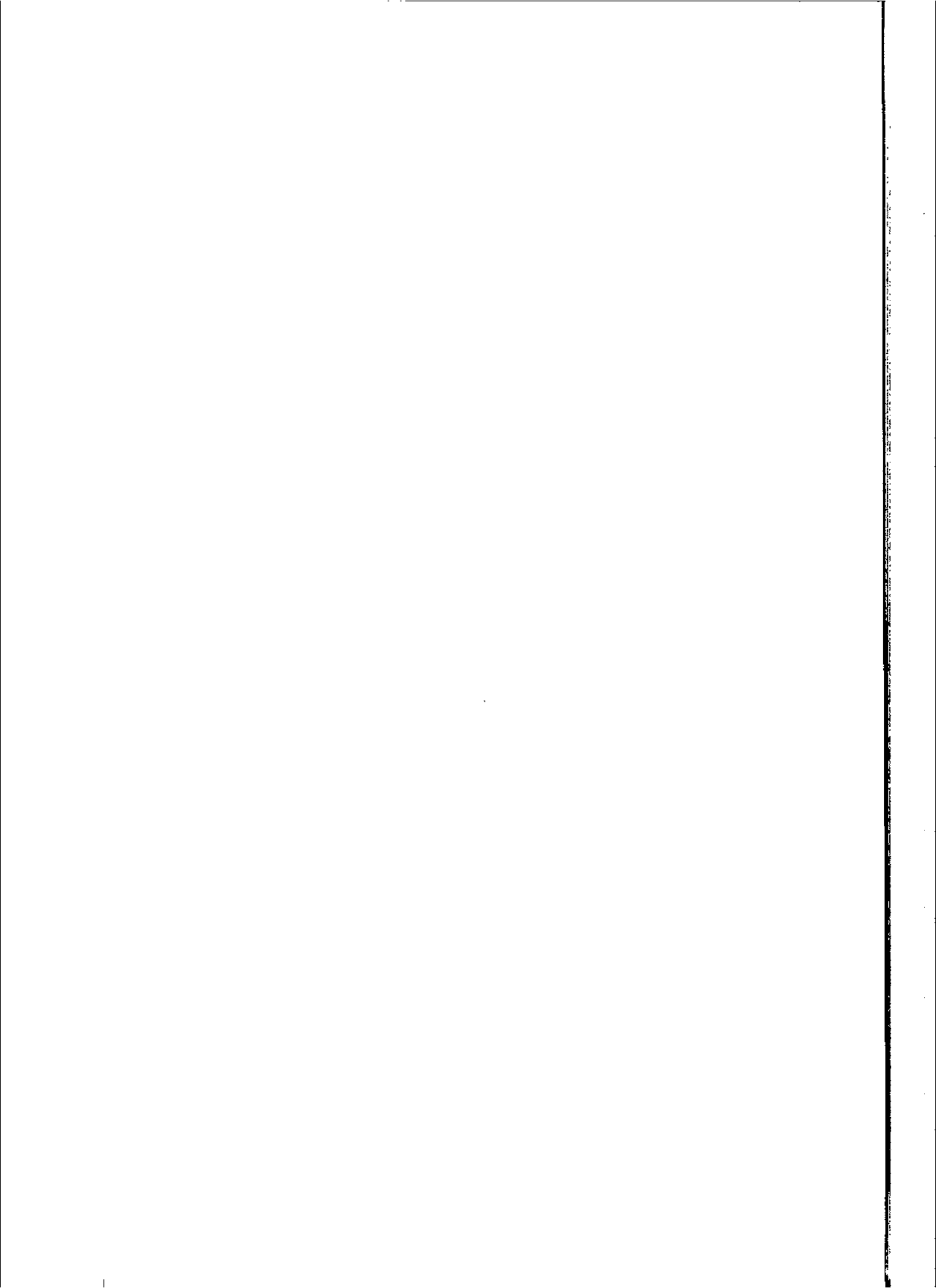
Wehrli F. W.; Wirthlin, T. *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*, Heyden,
London, **1978**, 310pp.

Williams, D. H.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1099-1101.

Williams, D. H.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5381-5390.

Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.;
Faulkner, D. J.; Xu, C.-F.; Clardy, J.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123-
3124.

부 록



**Stellettamide B, a New Indolizidine
Alkaloid from a Sponge of the
Genus *Stelletta***

**Jongheon Shin, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho,
and Chung J. Sim**

*Marine Natural Products Chemistry Laboratory, Korea Ocean Research
and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea,
and Department of Biology, Han Nam University,
Taejeon 300-791, Korea*

**JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS®**

Reprinted from
Volume 60, Number 6, Pages 611-613

Stellettamide B, a New Indolizidine Alkaloid from a Sponge of the Genus *Stelletta*

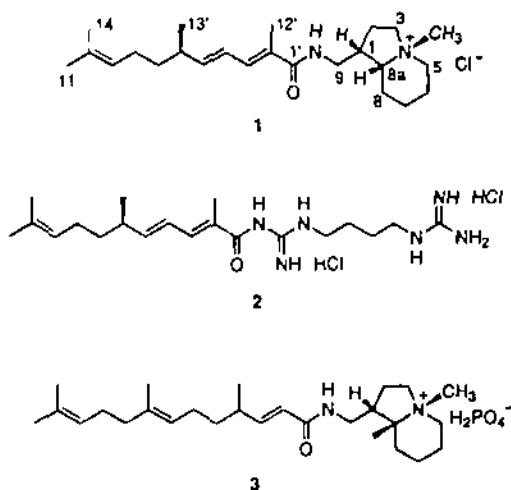
Jongheon Shin,*[†] Youngwan Seo,[†] Ki Woong Cho,[†] Jung-Rae Rho,[†] and Chung J. Sim[‡]

Marine Natural Products Chemistry Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea, and Department of Biology, Han Nam University, Taejeon 300-791, Korea

Received January 10, 1997*

Stellettamide B and stellettadine A, two alkaloids possessing carbon skeletons of mixed biogenetic origins, have been isolated from a sponge of the genus *Stelletta*. The structure of stellettamide B, a novel indolizidine alkaloid, has been determined by combined chemical and spectral methods. These compounds exhibited moderate antifungal and RNA-cleaving activities.

In our search for bioactive substances from Korean water organisms, we encountered a sponge of the genus *Stelletta* whose organic extract exhibited moderate brine shrimp lethality and antifungal activity. Activity-guided isolation using various chromatographic techniques yielded two alkaloids possessing carbon frameworks of mixed biogenetic origins. In this paper, we report the structure determination and bioactivities of stellettamide B (1), a novel compound, and stellettadine A (2), a very recently isolated metabolite of the same sponge collected from Japanese waters.¹ Both compounds possessed a linear norsesquiterpene moiety as a common structural feature; however, these compounds were structurally very distinct from each other. Stellettamide B contained an indolizidine skeleton identical with that of stellettamide A (3), a previously reported metabolite of another Japanese sponge *Stelletta* sp., while stellettadine A possessed a linear bisguanidinium unit.²



The brown encrusting sponge (specimen no. 94K-25) was collected off the shore of Keomun Island, South Sea, Korea.³ The specimens were exhaustively extracted with MeOH and CH₂Cl₂. After removal of salt by a partitioning of the combined crude extracts between *n*-BuOH and H₂O, the *n*-BuOH layer was repartitioned

between *n*-hexane and 10% aqueous MeOH. Separation of the aqueous MeOH layer by C₁₈ reversed-phase flash chromatography followed by Sephadex LH-20 column chromatography and reversed-phase HPLC of moderately polar fractions yielded pure alkaloids.

Stellettamide B (1) was isolated as a yellow gum that analyzed for C₂₄H₄₁N₂O by a combination of HRFABMS and ¹³C-NMR spectrometry. The presence of an amide functionality was readily recognized by a quaternary carbon signal at δ 172.37 in the ¹³C-NMR spectrum (Table 1) and characteristic absorption bands at 3440 (br) and 1650 cm⁻¹ in the IR spectrum. A UV maximum of 262 nm revealed that the amide contained at least one set of conjugated double bonds.

The structure of the indolizidine part was determined by 2D NMR experiments. Despite partial overlapping of the upfield proton signals, a combination of the ¹H COSY and HMQC data enabled us to define a bicyclic system as well as assignments of carbons and protons. In addition, the TOCSY data showed several long-range correlations in which the key correlations were observed between the H-3 α (δ 3.90) and H-8 α (δ 3.67), H-3 (δ 3.90 and 3.28) and H-9 (δ 3.44), and H-5 α (δ 3.58) and H-8 α (δ 3.67). This interpretation was further supported by HMBC correlations between the H-3, H-8 α , H-9, and 4-Me protons and neighboring carbons (Table 1).

The structure of the remaining norsesquiterpene unit was also determined by a combination of the 2D NMR techniques including ¹H-COSY, HMQC, and HMBC experiments. In particular, it was possible to define the spin system throughout the entire chain by the TOCSY data in which overlapping correlations among all of the protons between H-3' and Me-13', H-5' and Me-12', H-5' and H-7', H-6' and H-9', and Me-11' (also Me-14') and Me-13' were clearly observed. The geometry of two asymmetric double bonds at C-2' and C-4' was assigned as 2'E,4'E by NOESY correlations (H-3' and H-5', H-4' and Me-12') and measurement of the proton-proton coupling constant ($J_{4',5'} = 15.1$ Hz).

Although the connection of the indolizidine with norsesquiterpene parts was not directly observed from the HMBC experiments (i.e., H-9 - C'-1), the downfield chemical shifts of the H-9 (δ 3.44 and 3.32) and the molecular formula suggested the connection of partial structures by an amide bond in 1. The quaternary ammonium (N-4) of 1 indicated the presence of a counterion. This anion was determined as a chloride

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 82 (345) 400-6170, FAX: 82 (345) 406-5820 E-mail: jhshin@sari.kordi.re.kr.

[†] Marine Natural Products Chemistry Laboratory.

[‡] Department of Biology.

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, May 15, 1997.

Table 1. NMR Assignments for Stelletamide B (1)^a

no.	H	C	HMBC ^b
1	3.16 (1 H, m)	40.5	
2	2.40 (1 H, m), 2.00 (1 H, m)	25.1	
3	3.90 (1 H, ddd, 11.7, 11.7, 7.3) 3.28 (1 H, m)	57.6	2, 4-Me
5	3.58 (1 H, br d, 13.5) 3.40 (1 H, ddd, 13.5, 13.2, 3.9)	61.0	
6	1.89 (1 H, m), 1.85 (1 H, m)	21.1	
7	2.00 (1 H, m), 1.53 (1 H, br d, 13.2)	21.6	
8	1.94 (1 H, m), 1.59 (1 H, m)	23.3	
8a	3.67 (1 H, m)	74.0	2, 3
9	3.44 (1 H, dd, 13.2, 7.3) 3.32 (1 H, dd, 13.2, 6.9)	40.1	1, 2 8a
4-Me	3.14 (3 H, s)	54.3	3, 5, 8a
1'		172.4	
2'		129.0	
3'	6.83 (1 H, br d, 11.2)	135.6	1', 5', 12'
4'	6.35 (1 H, ddd, 15.1, 11.2, 1.0)	125.39	2', 3', 6'
5'	5.90 (1 H, m), 15.1, 8.3)	148.5	3', 7', 13'
6'	2.28 (1 H, m)	38.3	4', 5', 7', 8', 13'
7'	1.36 (2 H, m)	38.0	
8'	1.94 (2 H, m)	26.9	
9'	5.09 (1 H, br t, 7.1)	125.41	
10'		132.3	
11'	1.67 (3 H, br s)	25.9	
12'	1.92 (3 H, d, 1.0)	12.9	2', 3'
13'	1.03 (3 H, d, 6.4)	20.8	5', 6'
14'	1.68 (3 H, br s)	17.8	9', 10', 11'

^a ¹H- and ¹³C-NMR spectra were obtained in CD₃OD solutions at 500 and 125 MHz, respectively. Assignments were aided by COSY, TOCSY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments. ^b Parameters were optimized for 7 Hz CH coupling constants.

by an energy-dispersive spectroscopic experiment performed on a scanning electron microscope.

The indolizidine system of 1 possessed asymmetric centers at C-1, N-4, and C-8a. Configurations of these centers were determined by NOESY experiments. The NCH₃ protons exhibited correlations with the H-3β (δ 3.28) and H-5β (δ 3.40) protons, while the H-1 proton showed strong correlations with the H-9 protons. Due to the proximity of signals of H-1 (δ 3.16) and NCH₃ (δ 3.14) in the ¹H-NMR spectrum, however, the key correlations among the H-1, H-8a, and NCH₃ protons were not clear. This problem was solved by performing the NOESY experiment in Me₂CO-d₆ in which the mutual correlations among these protons were clearly observed (H-1a; δ 3.56, H-8a; δ 4.10, N-CH₃; δ 3.37). Thus, the relative configurations were defined as 1S*,4S*,8aR*.

In addition to the indolizidine system, compound 1 possessed an asymmetric carbon center at C-6'. The absolute configuration of this center was determined using oxidation to 2-methylglutaric acid, a method adopted for the structure determination of stellettidine A.¹⁴ Treatment of 1 with NaIO₄ in the presence of RuCl₃·xH₂O as a catalyst yielded (S)-2-methylglutaric acid that was confirmed by comparison of the ¹H-NMR and GC analysis data with an authentic sample and measurement of optical rotation ([α]_D²⁵ +17.5° (lit.¹ [α]_D²⁵ +22°)). Thus, the structure of stelletamide B was unambiguously determined as an alkaloid consisting of a norsesquiterpene and an indolizidine unit. Compounds possessing the indolizidine system have been rather rarely isolated from marine organisms. To the best of our knowledge, this indolizidine skeleton of stelletamide B has been predated only by stelletamide A from the sponge *Stelletta* sp. and piclavines from the tunicate *Clavelina picta*.^{6,7}

Compound 2 was isolated as a yellow gum that analyzed for C₂₀H₃₆N₆O by a combination of HRFABMS

and ¹³C-NMR spectrometry. NMR analysis of 2 showed that this compound possessed the identical norsesquiterpene unit as 1; however, the indolizidine system of 1 is replaced by a highly symmetric C₆ unit, both termini consisting of carbons bearing heteroatoms (δ 158.58 and 155.68 in the ¹³C-NMR spectrum). The molecular formula revealed that these were carbons of guanidines (or guanidiniums). A 20-nm bathochromic shift of UV maximum in 2 supported the attachment of a guanidines to the carbonyl carbon of the norsesquiterpene unit. Thus, 2 is an alkaloid possessing a linear bisguanidino unit. A literature survey revealed that 2 was identical with stellettidine A recently isolated from the sponge *Stelletta* sp.¹ Comparison of spectral data showed very good correlation with published data for this compound.⁸ Stellettidine A and stelletamide A were reported to exhibit various bioactivities; the former induced larval metamorphosis of the ascidian *Halocynthia roretzi*, the latter was cytotoxic and antifungal. In our measurement of antifungal activity using paper-disk method, stelletamide B (1) and stellettidine A (2) were moderately active against *Candida albicans* (inhibition zone 4 and 9 mm for 1 and 2, respectively) at the concentration of 25 μg/mL.

In addition to the antifungal activity, a very interesting biochemical action of 1 and 2 was found. In a measurement of reverse-transcriptase-inhibiting activity using agarose-gel electrophoresis, we found that the substrate RNA was totally digested. Subsequently, in a similar test using pure rRNAs and mRNA, stellettidine A and stelletamide B cleaved both single- and double-stranded RNA at the concentration of 50 μg/mL. The mechanism of this activity is currently under investigation, and the results will be published in due course.

Experimental Section

General Experimental Procedures. NMR spectra were recorded in CD₃OD and (CD₃)₂CO solutions on a Varian Unity 500 spectrometer. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were measured at 500 and 125 MHz, respectively. All of the chemical shifts were recorded with respect to internal Me₄Si. UV spectra were obtained in MeOH using a Milton-Roy spectrophotometer. IR spectra were recorded on a Mattson GALAXY spectrophotometer. Mass spectra were obtained by using a VG ZAB-2FHF high resolution mass spectrometer and provided by the Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside. The FABMS data were obtained by adding the sample dissolved in MeOH to NBA (nitrobenzyl alcohol) matrix. The optical rotations were measured on a JASCO digital polarimeter using a 5-cm cell. Energy dispersive spectra were obtained by electron bombardments at 30 kV on a Philips 515 scanning electron microscope. GC analysis was performed on a Hewlett-Packard HP 5890 II gas chromatograph using an Ω-wax-320 column. Temperatures of injector, detector, and oven were 280, 280, and 180 °C, respectively. All solvents used were spectral grade or were distilled from glass prior to use.

Animal Material. The specimens of *Stelletta* sp. (order Astrophorida, family Stellettidae) were collected by hand using scuba at 20–30 m depth in August 1994, along the offshore of Keomun Island, South Sea, Korea.³ This sponge was massive (2-cm thick), and the color was

dark brown. The specimens were firm and slightly compressible. The skeleton was formed with large oxea (780–1250 × 15–32 μm) and plagiotriaene (450–750 × 20–48 μm) arranged compactly at the sponge surface, large oxyaster (30–50 μm in diameter), and small oxyaster (7.5–20 μm in diameter). This sponge was similar to *S. grubii* Schmidt in its spicule type;⁹ however, our specimens had shorter megascleres than *S. grubii* (oxea 2000–2200 × 60 μm, plagiotriaene 1200 × 60 μm). In addition, large and small oxyasters had microspines at the end of the sharply pointed ray.

Extraction and Isolation. The samples were immediately frozen and kept at –25 °C until chemically investigated. The sponge (0.9 kg, wet wt) was defrosted, macerated, and extracted with MeOH (2 L × 2) and CH₂Cl₂ (2 L × 2). The combined extracts (29.1 g) were partitioned between H₂O and *n*-BuOH. The *n*-BuOH layer was dried under vacuum (6.4 g) and repartitioned between *n*-hexane and 10% aqueous MeOH. The aqueous MeOH layer (3.7 g) was dried and separated by C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography (YMC ODS A 60-I25 gel) by using sequential mixtures of H₂O and MeOH as eluents (10, 20, 30, 50% aqueous MeOH, and MeOH). The fractions eluted with 10% and 20% aqueous MeOH were combined and subjected to Sephadex LH-20 column chromatography (100% MeOH). Fractions containing alkaloids were combined and separated by C₁₈ reversed-phase HPLC (Shiseido Capcell column, 25% aqueous MeOH). Final purifications were made by C₁₈ reversed-phase HPLC (YMC ODS-H80 column, 35% aqueous MeOH) to yield 106 mg of 1 and 21 mg of 2.

Stelletamide B (1): a yellow gum; [α]_D²⁵ –24.2° (c 0.5, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 262 (4.20) nm; IR (KBr) ν_{max} 3440 (br), 2930, 1650, 1535, 1450, 1380, 975 cm⁻¹; HRFABMS [M + H]⁺ *m/z* 373.3210, calcd for C₂₄H₄₁N₂O 373.3219.

Stelletadine A (2): a yellow gum; [α]_D²⁵ –25.3° (c 0.4, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 282 (4.02) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2960, 1630, 1460, 1380, 1250, 1100, 980 cm⁻¹; HRFABMS [M + H]⁺ *m/z* 377.3012, calcd for C₂₀H₃₇N₂O 377.3029.

Oxidative Cleavage of Stelletamide B (1). To a biphasic solution of 6.6 mg (0.016 mmol) of 1 and 41.3 mg (0.192 mmol) of NaIO₄ in a mixture of 1 mL of CCl₄, 1 mL of CH₃CN, and 1.5 mL of H₂O was added 21.5 mg (0.104 mmol) of RuCl₃·xH₂O. After vigorous stirring the mixture for 2 h at room temperature, the solvents were

removed under vacuum. The residue was redissolved in MeOH and filtered on an ODS Cepak column. The filtrate was dried and separated by reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 5% aqueous MeOH) to give 1.1 mg of 2-methylglutaric acid (48% yield): [α]_D²⁵ +17.5° (c 0.08, MeOH) [lit.¹ [α]_D²⁵ +24.4° (c 0.5% in CHCl₃), lit.⁵ [α]_D²⁵ +22° (c 0.033 in MeOH)]; ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.45 (1 H, m), 2.32 (2 H, m), 1.89 (1 H, m), 1.72 (1 H, m), 1.16 (3 H, d, *J* = 6.8 Hz). The synthetic 2-methylglutaric acid was dissolved in 1 mL of 5% HCl–MeOH and left overnight at room temperature. After removing the solvent under vacuum, the residue was redissolved and analyzed on a gas chromatograph. Dimethyl 2-methylglutarate had a retention time of 4.355 min. An authentic compound formed by the same method from (±) 2-methylglutaric acid (Aldrich) gave a peak at 4.357 min.

Acknowledgment. We thank Mr. Hosung Chung, Polar Research Center, KORDI, for assistance of collecting sponge samples. Special thanks go to Mr. Chun-Yoon Kang, Polar Research Center, KORDI, for performing energy dispersive spectrometric experiments. We gratefully acknowledge Drs. Nobuhiro Fusetani and Sachiko Tsukamoto, Fusetani Biofouling Project, Exploratory Research for Advanced Technology, Research Development Corporation of Japan, for permitting us to examine the spectral data of stelletadine A. This research was financially supported by Korean Ministry of Science and Technology Grant BSPN-00300 and –00317.

References and Notes

- (1) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 5555–5556.
- (2) Hirota, H.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 4163–4164.
- (3) The voucher specimens under the registry no. Por. 26 are on deposit at the Natural History Museum, Han Nam University, Taejeon, Korea under the curatorship of C. J. S.
- (4) Carlsen, P. H. J.; Katsuki, T.; Martin, V. S.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* 1981, 46, 3936–3938.
- (5) Blackburne, I. D.; Sutherland, M. D. *Aust. J. Chem.* 1972, 25, 1779–1786.
- (6) Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* 1996, 13, 75–125, and references cited therein.
- (7) Raub, M. F.; Cardellina II, J. H.; Spande, T. F. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 2257–2260.
- (8) The counter ions of stelletadine A were determined as chlorides by energy dispersive spectrometry.
- (9) Hoshino, T., *J. Sci. Hiro Univ. Ser. B. Div. I.* 1981, 29, 207–289

NP970041H

Sesquiterpenoids of the Drimane Class from a Sponge of the Genus *Dysidea*

**Valerie J. Paul, Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho,
Jongheon Shin, and Patricia R. Bergquist**

Marine Laboratory, University of Guam, Mangilao 96923, Guam,
Marine Natural Products Chemistry Laboratory, Korea Ocean Research
& Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea,
and School of Biological Sciences, The University of Auckland, Private
Bag 92019, Auckland, New Zealand

**JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS®**

Reprinted from
Volume 60, Number 11, Pages 1115–1120

Sesquiterpenoids of the Drimane Class from a Sponge of the Genus *Dysidea*

Valerie J. Paul,^{*1} Youngwan Seo,² Ki Woong Cho,² Jung-Rae Rho,³ Jongheon Shin,^{*3} and Patricia R. Bergquist⁴

Marine Laboratory, University of Guam, Mangilao 96923, Guam, Marine Natural Products Chemistry Laboratory, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea, and School of Biological Sciences, The University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand

Received July 11, 1997^{*}

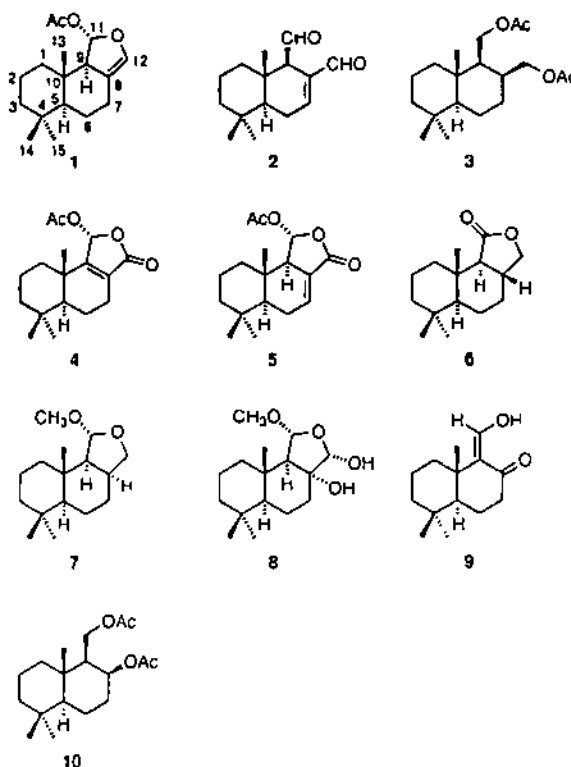
Ten sesquiterpenoids, including seven new ones, have been isolated from an undescribed sponge of the genus *Dysidea*. Compounds 1–8 are sesquiterpenoids of the drimane class, while 9 and 10 are 12-norsesquiterpenoids of the same structural class. The structures of novel compounds have been determined by combined spectroscopic methods. These compounds exhibited moderate antimicrobial and enzyme inhibitory (Na^+/K^+ -ATPase and PLA_2) activities.

Sesquiterpenoids of the drimane class are widely recognized as bioactive metabolites of terrestrial plants and marine animals such as mollusks and sponges.¹ Among sponges, these compounds have been frequently isolated from *Dysidea* spp.^{2–4} We encountered a species of *Dysidea* in a reef habitat on Guam that commonly overgrows another sponge, *Cacospongia* sp., causing necrosis and damage to the *Cacospongia* sp. by destroying its basal portions. In field experiments, crude extracts of *Dysidea* sp. and its major metabolite 7-deacetoxyolepupane caused necrosis in *Cacospongia* sp. when incorporated into agar strips at natural concentrations and placed in contact with *Cacospongia* sp. for 7 days.⁵ In addition to its role in competition, 7-deacetoxyolepupane deterred predation by a spongivorous fish, *Pomacanthus imperator*, illustrating the multiple ecological roles that a single secondary metabolite may play.⁵

We also found that the crude organic extract of *Dysidea* sp. exhibited potent antimicrobial activity against several strains of marine bacteria. Because of the multiple biological activities observed for the organic extract, we became interested in characterizing the complex mixture of sesquiterpenoids present in *Dysidea* sp. We isolated several sesquiterpenoids of the drimane class by chromatographic methods. Herein we report the structures and bioactivities of 10 compounds including seven new ones. Compounds 1–8 are sesquiterpenoids of the drimane class whose structural variations exist in the highly functionalized C ring, while 9 and 10 are unusual 12-norsesquiterpenoids of the same structural class. Several compounds exhibited moderate antimicrobial activity and/or inhibitory activity against Na^+/K^+ -ATPase and PLA_2 .

Results and Discussion

The sponge was collected at a site known as Sponge Mound in Apra Harbor, Guam (Mariana Islands),⁶ and was lyophilized, macerated, and exhaustively extracted with CH_2Cl_2 and MeOH. The combined crude extracts were separated by silica vacuum flash chromatography using sequential mixtures of *n*-hexane and EtOAc as eluents. The presence of secondary metabolites in



nonpolar and moderately polar fractions was recognized by $^1\text{H-NMR}$ analysis. Separation by silica and reversed-phase HPLC of these fractions yielded 10 compounds.

The structures of three known metabolites, 7-deacetoxyolepupane (1), polygodial (2), and a derivative (3), were determined by a combination of spectroscopic analysis and comparison with reported data for these compounds.^{2–4,7} 7-Deacetoxyolepupane, previously isolated from the nudibranch mollusks *Dendrodoris* spp.⁸ and an Australian sponge of the genus *Dysidea*,² was the major metabolite; 1.9% of the dried sponge. Polygodial, a well-known bioactive constituent of terrestrial plants and marine mollusks,^{1,7} was isolated for the first time from a sponge in this study. Compound 3 was isolated very recently from the sponge *D. fusca* collected from New Caledonia.⁴

Compound 4 was isolated as a colorless oil. The molecular formula for this compound was deduced as

^{*} To whom correspondence should be addressed. Phone: 82 (345) 400-6170 FAX: 82 (345) 408-4493. E mail: jhshin@sari.kordi.re.kr.

¹ University of Guam

² Korea Ocean Research & Development Institute

³ The University of Auckland

⁴ Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, November 1, 1997

Table 1. Proton NMR Assignments for Sesquiterpenoids 4-8^{a,b}

position	4	5	6	7	8
1ax	1.47 (m)	1.19 (ddd, 13.2, 13.2, 3.4)	1.07 (br ddd, 13.2, 13.2, 3.4)	1.04 (ddd, 13.7, 13.2, 3.9)	1.09 (ddd, 13.2, 13.2, 2.4)
1eq	1.53 (m)	1.61 (br d, 13.2)	2.43 (ddd, 13.2, 4.9, 3.4)	1.70 (m)	1.71 (ddd, 13.2, 4.9, 2.9)
2ax	1.63 (br dddd, 13.7, 13.7, 13.2, 2.9)	1.52 (m)	1.61 (dddd, 13.7, 13.2, 13.2, 3.4, 3.4)	1.56 (m)	1.55 (m)
2eq	1.47 (m)	1.47 (m)	1.45 (m)	1.37 (m)	1.42 (m)
3ax	1.22 (ddd, 13.2, 13.2, 3.4)	1.21 (ddd, 13.7, 13.7, 3.4)	1.19 (m)	1.16 (ddd, 13.7, 13.2, 3.9)	1.17 (m)
3eq	1.47 (m)	1.47 (m)	1.42 (m)	1.39 (m)	1.42 (m)
5	1.32 (dd, 12.7, 2.0)	1.36 (dd, 11.7, 5.4)	0.90 (dd, 13.2, 2.9)	0.80 (dd, 12.2, 2.1)	0.86 (dd, 12.2, 2.0)
6ax	1.53 (m)	2.09 (dddd, 20.6, 11.7, 3.4, 3.4)	1.28 (dddd, 13.7, 13.2, 12.7, 3.9)	1.26 (dddd, 13.7, 13.2, 12.2, 4.4)	1.21 (m)
6eq	1.91 (br dd, 13.7, 6.8)	2.42 (dddd, 20.6, 5.4, 3.4, 3.4)	1.74 (dddd, 13.2, 3.4, 2.9, 2.9)	1.46 (dddd, 13.7, 2.9, 2.9, 2.1)	1.61 (m)
7ax	2.17 (dddd, 18.6, 11.2, 6.8, 1.5)		1.19 (m)	1.61 (m)	1.51 (ddd, 13.7, 13.7, 5.9)
7eq	2.40 (br dd, 18.6, 6.4)	6.90 (ddd, 3.4, 3.4, 3.4)	1.95 (dddd, 12.2, 3.4, 3.4, 2.9)	1.67 (m)	2.00 (ddd, 13.7, 3.9, 2.4)
8			2.34 (m)	2.59 (m)	
9		2.68 (m)	1.69 (d, 13.7)	1.64 (br d, 7.3)	1.80 (br s)
11	6.95 (dd, 1.9, 1.5)	6.43 (d, 5.9)		4.72 (br s)	4.66 (br s)
12			4.23 (dd, 8.3, 6.4)	3.96 (dd, 9.3, 7.8)	5.15 (br s)
13	1.16 (s)	0.84 (s)	0.98 (s)	3.56 (dd, 11.2, 8.3)	
14	0.88 (s)	0.91 (s)	0.81 (s)	0.90 (s)	0.87 (s)
15	0.94 (s)	0.90 (s)	0.85 (s)	0.82 (s)	0.80 (s)
OAc	2.11 (s)	2.12 (s)		0.86 (s)	0.89 (s)
OMe				3.28 (s)	3.36 (s)

^a Measured in CDCl₃ solutions at 500 MHz; δ in ppm (J in Hz); TMS as internal standard. ^b Assignments were aided by ¹H COSY, HMQC, and HMBC experiments.

Table 2. Carbon NMR Assignments for Compounds 4-10^{a,b}

no.	4	5	6	7	8	9	10
1	34.5 t	38.7 t	37.2 t	41.9 t	41.3 t	38.3 t	39.5 t
2	18.2 t	18.1 t	18.2 t	18.3 t	18.4 t	18.9 t	18.3 t
3	41.4 t	42.0 t	42.3 t	41.9 t	41.7 t	41.4 t	41.8 t
4	33.3 s	32.9 s	33.1 s	33.0 s	32.9 s	32.9 s	33.2 s
5	50.9 d	49.3 d	55.5 d	52.4 d	52.2 d	50.3 d	55.3 d
6	18.0 t	25.0 t	21.2 t	17.9 t	18.7 t	17.7 t	17.3 t
7	21.4 t	137.6 d	28.7 t	23.9 t	30.9 t	33.1 t	31.5 t
8	128.4 s	126.3 s	38.3 d	34.1 d	76.9 s	188.9 s	69.2 d
9	165.6 s	56.1 d	57.4 d	58.8 d	65.1 d	122.8 s	51.5 d
10	37.3 s	33.9 s	35.7 s	34.3 s	35.0 s	35.3 s	37.0 s
11	90.7 d	93.5 d	175.8 s	107.2 d	105.4 d	183.0 d	61.0 t
12	170.9 s	166.6 s	71.2 t	72.2 t	102.2 d		
13	21.7 q	14.2 q	15.5 q	16.0 q	15.3 q	25.0 q	13.0 q
14	21.4 q	21.2 q	21.2 q	22.0 q	21.9 q	21.3 q	21.7 q
15	33.3 q	33.0 q	33.5 q	33.5 q	33.5 q	33.3 q	33.6 q
OMe				54.3 q	54.3 q		
OAc	169.1 s	169.1 s					171.3 s
							170.5 s
	20.9 q	20.9 q					21.4 q
							21.0 q

^a Measured in CDCl₃ solutions. ^b Assignments were aided by DEPT, HMQC, and HMBC experiments.

C₁₇H₂₄O₄ by a combination of HRMS and ¹³C-NMR analysis. The presence of an α,β -unsaturated lactone was readily recognized by signals of quaternary carbons at δ 170.9, 165.6, and 128.4 in the ¹³C-NMR spectrum. This interpretation was supported by a strong absorption band at 1760 cm⁻¹ in the IR spectrum and an absorption maximum at 221 nm (log ϵ 3.65) in the UV spectrum. The signal for a methine carbon at δ 90.7 and a corresponding proton signal at δ 6.95 (1H, dd, J = 1.9, 1.5 Hz) in the NMR data revealed the presence of an acetal functionality (Tables 1 and 2).

With the aid of this information, the structure of 4 was determined by a combination of ¹H COSY, HMQC, HMBC, and NOESY experiments. Long-range correlations of H-5, H-6, Me-13, Me-14, and Me-15 with neighboring carbons were particularly helpful in determining the structure of the A and B rings. The presence of a lactone ring and the attachment of an acetoxy group to it were secured by long-range correlations of the acetal proton at δ 6.95 in the ¹H-NMR spectrum

with both of the carbonyl carbons in the lactone and acetoxy groups. The acetoxy-bearing lactone ring could be arranged in two ways; the lactone carbonyl and acetal carbons could be located at either C-11 or C-12. Assignments of the former to C-12 and the latter to C-11, respectively, were established on the basis of the chemical shifts of C-8 and C-9 determined by HMBC experiments; C-8 and C-9, δ 128.4 and 165.6, respectively (Table 2). The orientation of the AB ring junction was determined as *trans* by NOE correlations of H-5 and Me-13 with ring protons as well as the splitting pattern of H-5 at δ 1.32 (1H, dd, J = 12.7, 2.0 Hz) in the ¹H-NMR spectrum. Similarly the 11*R** configuration was assigned on the basis of a NOE correlation between H-11 and Me-13.

Compound 5 was isolated as a colorless oil. The molecular formula for this compound was established as C₁₇H₂₄O₄, identical with that of 4, by a combination of HRMS and ¹³C-NMR spectrometry. Spectral data for this compound were very similar to those obtained for 4. The only significant difference in the ¹³C-NMR spectrum was the replacement of the C-9 quaternary carbon at δ 165.6 of 4 by a methine carbon at δ 56.1 and the replacement of the C-7 methylene at δ 21.4 by an olefinic carbon at δ 137.6. The corresponding difference was also observed in the ¹H-NMR spectrum in which the signal for a new olefinic proton appeared at δ 6.90 (1H, ddd, J = 3.4, 3.4, 3.4 Hz). These differences were accommodated by a shift of the double bond from C-8 in 4 to C-7 in 5 and were confirmed by 2-D NMR experiments. The long-range correlations of H-9 with C-7 and C-13 were especially useful for this assignment. The relative configurations of the asymmetric carbon centers in ring C were assigned as 9*R**, 11*R** by NOESY correlations between H-5 and H-9 and also between the H-11 and Me-13 protons.

The molecular formula for compound 6, isolated as a white solid, was established as C₁₅H₂₄O₂ by combined HRMS and ¹³C-NMR analysis. The presence of a lactone ring was readily recognized by the signal for a

quaternary carbon at δ 175.8 in the ^{13}C -NMR spectrum and an absorption band at 1765 cm^{-1} in the IR spectrum. The structure of this compound was determined by combined 2-D NMR methods. The position of the carbonyl carbon was assigned to C-11 on the basis of HMBC correlations of this carbon with H-9 and H-12. In addition to the *trans* AB ring junction, **6** possessed additional asymmetric carbon centers at C-8 and C-9. The relative configurations of these centers were assigned as $8R^*,9S^*$ on the basis of the large coupling ($J_{8,9} = 13.7\text{ Hz}$) between these protons and a strong 1,3-diaxial NOE correlation between H-8 and Me-13.

The molecular formula of **7** was established as $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$ by HRMS and ^{13}C -NMR spectrometry. NMR data for this compound were similar to those obtained for **6**. The only significant difference in the ^{13}C -NMR data was the replacement of the carbonyl carbon at C-11 (δ 175.8) of **6** by an acetal (δ 107.2) and a methoxy (δ 54.3) group in **7**. Corresponding changes were also observed in the ^1H -NMR spectrum in that signals of the new acetal and methoxy protons were found at δ 4.72 (1H, br s) and 3.28 (3H, s), respectively. The structure of **7** was determined by a combination of ^1H COSY, HMQC, and HMBC experiments. The ether linkage between C-11 and C-12 was established by long-range correlations between these carbons and attached protons; C-11 and H-12, C-12 and H-11. Similarly, the attachment of the methoxy group to C-11 was confirmed by a long-range correlation between the methoxy proton and C-11.

Compound **7** possessed three neighboring asymmetric centers at C-8, C-9, and C-11. The stereochemistry of these centers was assigned on the basis of NOESY data. Spatial proximity between C-12 and C-13 was revealed by a NOE correlation between one (δ 3.56) of the H-12 methylene and the Me-13 protons. In addition, a NOE correlation was observed between H-5 and H-9. A molecular model study showed that, to exhibit these NOE correlations, the BC ring junction must be *cis* oriented, H-8 α , H-9 α . The β orientation of H-11 was also determined by a NOE correlation between this proton and Me-13. Thus, the relative configurations of the asymmetric centers of the C ring were assigned as $8R^*,9S^*,11R^*$. A literature survey revealed that the hemiacetal corresponding to **7** has been isolated from a sponge of the genus *Dysidea*³ and recently from *D. fusca*.⁴ The $11S^*$ configuration originally suggested³ was revised to $11R^*$ on the basis of NOE analysis.⁴ Comparison of spectral data showed good agreement between **7** and the hemiacetal.^{3,4}

Compound **8** was isolated as a colorless gum. The HRCIMS for this compound, obtained by using NH_3 as a carrier gas, showed a quasi-molecular ion peak at m/z 284.2225 that was interpreted as $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$ by mass calculation and ^{13}C -NMR analysis. Observation of four oxygen-bearing carbons at δ 105.4 (CH), 102.2 (CH), 76.9 (C), and 54.3 (CH_3) in the ^{13}C -NMR spectrum and a broad absorption band at 3450 cm^{-1} in the IR spectrum, however, suggested that **8** contained an additional hydroxyl group. Therefore, the molecular formula of **8** was thought to be $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_4$. The NMR data for **8** were reminiscent of those obtained for **7**. A combination of 2-D NMR data revealed that **8** possessed the same A and B rings as **7**. Replacement of signals of C-8 and C-12, observed at δ 34.1 (CH) and 72.2 (CH_2),

respectively, in the ^{13}C -NMR spectrum of **7** by downfield signals at δ 102.2 (CH) and 76.9 (C) in **8** revealed that hydroxyl groups were attached to these carbons (Table 2). Thus, the C-12 oxymethylene of **7** was converted to an acetal (or hemiacetal) in **8**, while the C-8 methine was converted to a quaternary carbinol group. Supporting information for these assignments was obtained by HMBC experiments in that H-9 exhibited long-range correlations with these carbons. Thus, compound **8** contained two acetal or hemiacetal carbons at C-11 and C-12. A long-range correlation of C-11 with methoxy protons revealed that C-11 and C-12 were the methoxy acetal and hemiacetal carbons, respectively. Thus, the structure of **8** was determined as the 8,12-dihydroxy derivative of **7**.

In addition to the *trans* AB ring junction, **8** possessed neighboring asymmetric centers at C-8, C-9, C-10, and C-11. A spatial proximity among H-1eq, H-11, and Me-13 was found by mutual NOE correlations among these protons. An additional NOE correlation was also observed between H-12 and Me-13. A three-dimensional model study revealed that, to exhibit these correlations, the BC ring junction must be *cis* oriented. In addition, both H-11 and H-12 must be β -oriented to ring C. This interpretation was further supported by NOE correlations of H-9 with H-1ax and H-5. Thus, the relative configurations of the C ring of **8** were defined as $8R^*,9R^*,11R^*,12S^*$.

Compound **9** was isolated as a white solid that was analyzed for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ by HRMS and ^{13}C -NMR spectrometry. In addition to the lack of one carbon in the molecular formula, spectral data for this compound were different from the other sesquiterpenoids in many aspects. The ^{13}C -NMR spectrum of **9** showed three downfield signals at δ 188.9 (C), 183.0 (CH), and 122.8 (C) (Table 2). Although the former two carbons were initially thought to be an unsaturated ketone and aldehyde, respectively, the occurrence of only one signal in the olefinic region of the ^{13}C -NMR spectrum suggested the presence of an enolized β -dicarbonyl functionality. Supporting evidence for this interpretation included strong absorption bands at 3500 (broad, -OH) and 1620 (C=O stretching of β -hydroxy- α,β -unsaturated ketone) cm^{-1} in the IR spectrum and an absorption maximum at 294 nm ($\log \epsilon$ 3.34) in the UV spectrum. In addition, the ^1H -NMR spectrum showed a D_2O exchangeable signal at δ 15.36 (1H, d, $J = 4.4\text{ Hz}$) and another downfield signal at δ 8.60 (1H, d, $J = 4.4\text{ Hz}$), which were coupled to each other (Table 3). Thus, compound **9** possessed an enolized β -dicarbonyl group stabilized by hydrogen bonding between the carbonyl oxygen and enolic hydroxyl proton.

The structural elucidation of **9** was aided by a combination of ^1H COSY, HMQC, and HMBC experiments. Long-range correlations of three methyl protons at δ 1.15 (Me-13), 0.91 (Me-15), and 0.86 (Me-14) with adjacent carbons were particularly helpful for determining the structure of the A and B rings. The presence of an α,β -unsaturated carbonyl group was confirmed by HMBC correlations between the olefinic proton at δ 8.60 and quaternary carbons at δ 188.9 and 122.8. An additional long-range correlation of the latter carbon with Me-13 enabled us to assign the location of the β -hydroxy- α,β -unsaturated carbonyl moiety to C-8, C-9, and C-11, which was further supported by a three-bond

Table 3. Proton NMR Assignments for Norsesquiterpenoids **9** and **10**^{a,b}

position	9	10
1ax	1.30 (ddd, 12.7, 12.7, 3.7)	1.04 (ddd, 13.2, 13.2, 3.4)
1eq	2.01 (br d, 12.7)	1.72 (br dd, 13.2, 3.4)
2ax	1.63 (m)	1.58 (dddd, 13.7, 13.7, 13.2, 3.4, 3.4)
2eq	1.53 (m)	1.41 (m)
3ax	1.20 (m)	1.16 (ddd, 13.7, 13.7, 3.4)
3eq	1.45 (dddd, 13.6, 3.3, 3.3, 1.5)	1.41 (m)
5	1.16 (dd, 12.0, 1.8)	0.90 (dd, 11.7, 2.0)
6ax	1.58 (m)	1.41 (m)
6eq	1.80 (br ddd, 13.6, 7.7, 1.8)	1.48 (m)
7ax	2.39 (ddd, 19.8, 11.0, 7.7)	1.48 (m)
7eq	2.48 (ddd, 19.8, 7.0, 1.8)	1.99 (br ddd, 13.2, 2.9, 2.9)
8		5.12 (ddd, 3.4, 2.9, 2.9)
9		1.53 (ddd, 10.7, 3.9, 3.4)
11	8.60 (d, 4.4)	4.14 (dd, 10.7, 3.9)
		4.01 (dd, 10.7, 10.7)
13	1.15 (d, 0.7)	1.00 (s)
14	0.86 (s)	0.84 (s)
15	0.91 (s)	0.86 (s)
OAc		2.03 (s, C-8), 2.00 (s, C-11)
OH	15.36 (d, 4.4)	

^a Measured in CDCl₃ solutions at 500 MHz; δ in ppm (J in Hz); TMS as internal standard. ^b Assignments were aided by ¹H COSY, HMQC, and HMBC experiments.

correlation of the carbon at δ 188.9 with H-6eq. Of the two possible arrangements of the unsaturated carbonyl group, that is, either a ketone and an enol or an enol and an aldehyde at C-8 and C-11, respectively, the former was proved to be correct because the coupling constant between the enol and olefinic protons ($J = 4.4$ Hz) was much larger than the homoallylic coupling expected from the latter arrangement. Thus, the structure of **9** was determined as a 12-norsesquiterpenoid of the drimane class.

The molecular formula of **10**, a white solid, was deduced as C₁₈H₃₀O₂ by HRCIMS and ¹³C-NMR analysis. The presence of two acetoxy groups, readily recognized by the NMR data, suggested that **10** was also a norsesquiterpenoid. Careful examination of the NMR data revealed that **10** was structurally closely related to **3**. In addition to the spectral changes due to the loss of a carbon, the only significant difference in the ¹³C-NMR data was the replacement of one of the oxymethylene carbons at δ 63.9 (C-12) and 62.7 (C-8) by an oxymethine carbon at δ 69.2. A corresponding difference was also observed in the ¹H-NMR spectrum in that a new downfield signal was found at δ 5.12 (1H, ddd, $J = 3.4, 3.9, 2.9$ Hz). Therefore, an oxymethylene group in **3** must be lost in compound **10**. The structure of **10** was defined with the aid of combined 2-D NMR methods. The ¹H COSY experiment showed that an upfield proton signal at δ 1.53 was coupled with all of the oxymethylene and oxymethine signals at δ 5.12, 4.14, and 4.01. This proton was assigned as H-9 because the carbon at δ 51.4 bearing this proton showed a long-range correlation with Me-13 in the HMBC experiment. Therefore, two acetoxy groups were attached to C-8 and C-11 of the 12-nordrimane skeleton. Supporting evidence for this interpretation was the HMBC correlations of H-11 with C-8 and C-9. In addition to the *trans* AB ring junction, the relative configurations of asymmetric carbon centers of **10** were assigned as 8S*,9S* on the basis of a NOESY correlation of H-9 with H-5 together with the small vicinal coupling ($J_{8,9} = 3.4$ Hz). Thus, the structure of **10** was determined as a diacetoxyated 12-norsesquiterpenoid of the drimane class.

Metabolites possessing norsesquiterpene carbon skeletons have been occasionally isolated from both marine and terrestrial organisms. Among compounds of the drimane class, 11-norsesquiterpenoids have been isolated from the folk medicinal plant *Polygonum hydropiper*.⁹ To the best of our knowledge, however, **9** and **10** are the first examples of 12-norsesquiterpenoids of the drimane class as natural products.

Some of the marine-derived drimane sesquiterpenoids have been reported to exhibit antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities.² In our antimicrobial assays, **2** exhibited potent inhibition (IC₅₀ 11.4 μ M) of the bioluminescence reaction of *Photobacterium leiognathi*, a symbiotic luminous bacterium of tropical fish, while **1**, **6**, **7**, and **10** exhibited weaker inhibition (IC₅₀ 90–145 μ M). In a method using filter paper disks, **2** was active (inhibition zone, 8 mm) against the same strain at a concentration of 10 μ g/mL. In addition, **2**, **4**, and **6** exhibited moderate inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase (IC₅₀ 82, 98, and 45 μ M for **2**, **4**, and **6**, respectively). Compound **6** was also weakly active against PLA₂ (IC₅₀ 113 μ M). All other compounds were inactive in the same tests.

In addition to their pharmacological activities, drimane sesquiterpenoids exhibit antifeedant activity against potential predators.¹ Polygodial (**2**), famous for its hot taste to humans, is reported to exhibit potent antifeedant activity against both terrestrial insects and carnivorous fish.^{10–12} Crude extracts of the *Dysidea* sp. and pure 7-deacetoxyolepupane (**1**) also showed antifeedant activity to reef fishes.⁵ The other compounds have not yet been tested as antifeedants.

Experimental Section

General Experimental Procedures. NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions on a Varian Unity-500 spectrometer. Proton and carbon NMR spectra were measured at 500 and 125 MHz, respectively. All of the chemical shifts were recorded with respect to internal Me₄Si. IR spectra were recorded on a Mattson GALAXY spectrophotometer. UV spectra were obtained in MeOH using a Milton-Roy spectrophotometer. Mass spectra were provided by the Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside. The optical rotations were measured on a JASCO digital polarimeter using a 5-cm cell. Melting points were measured on a Fisher-Johns apparatus and are reported uncorrected. All solvents used were spectral grade or were distilled from glass prior to use.

Animal Material. The specimens for extraction and taxonomic identification were collected by hand using scuba at 20–25 m depth in July 1996, off the western shore of Guam, at a site known as the Sponge Mound in Apra Harbor, Guam.⁶ The voucher specimens are deposited at the British Museum of Natural History (no. 1997.5.13.1). Morphological characters of the specimens are similar to those of the type species *D. fragilis* Montague. The sponge had an encrusting morphology covering areas of 4 × 3 in. and producing upright lobes. Color of both the exterior and interior was dark gray in life and deep brown in spirit. The texture is friable, delicate, and easily torn. The surface is strongly conulose, each conule having a single, apical primary fiber extending from it and accessory lateral conules and fibers. As a result of the heavy content of coring

material in the primary fibers, the sponge surface appears to have a whitish tracery. Oscules are not evident in the specimens, and the surface membrane between conules is smooth macroscopically but supports a thin superficial layer of uniformly sized sand grains. This layer is enhanced to 100 μm deep on conule surfaces and tips. The skeleton has a rectangular arrangement with simple primary fibers oriented to the conules, of even diameter (60–120 μm) throughout the body of the sponge and packed with sand grains, leaving very little clear spongin evident. Fiber construction is stratified, and secondary fibers are oriented at right angles to the primaries, unbranched and cored to half the fiber diameter. The tissue is evenly infiltrated with pigment cells and shows no collagen enhancement near the surface or around canals. There are no evident algal or cyanobacterial symbionts. Choanocyte chambers are oval, 40 μm in longest dimension.

Extraction and Isolation. The freshly collected animals were lyophilized (dry wt 25 g), macerated, and repeatedly extracted with CH_2Cl_2 and MeOH. The combined crude extracts (3.6 g) were separated by silica vacuum flash chromatography by using gradient mixtures of *n*-hexane and EtOAc as eluents. Fractions eluted with nonpolar solvents (10–15% EtOAc–hexane) were combined and separated by semipreparative silica HPLC (YMC silica column, 12% EtOAc–hexane) to yield compounds 1, 3, and 7 in the order of 1, 7 and 3; 465.0, 31.2, and 2.2 mg for 1, 3, and 7, respectively. Fractions eluted with slightly more polar solvents (20–25% EtOAc–hexane) were combined and subjected to silica HPLC (YMC silica column, 15% EtOAc–hexane) to yield 2, 4–6, 9, and 10 in the order of 6, 4, 5, 9, 10, and 2. Final purification was made by reversed-phase HPLC (YMC *J'* sphere ODS–H80 column, 100% CH_3CN) to isolate 6.7, 10.4, 9.1, 10.5, 6.3, and 16.0 mg for 2, 4–6, 9, and 10, respectively. Fractions eluted with moderately polar solvents (30–35% EtOAc–hexane) were separated by silica HPLC (15% EtOAc–hexane) and purified by reversed-phase HPLC (100% CH_3CN) using the same columns to yield 2 and 8; 24.6 and 3.1 mg for 2 and 8, respectively.

7-Deacetoxyolepupuanone (1): white solid; mp 79–80 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –153.9° (c 1.0, MeOH) (lit.^{2,3} $[\alpha]_D^{25}$ –166.7°);^{2,3} HREIMS (M)⁺ *m/z* 278.1871 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$, 278.1882).

Polygodial (2): white solid; mp 53–55 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –123.4° (c 0.3, EtOH) (lit.^{13,14} $[\alpha]_D^{25}$ –131°); IR (KBr) ν_{max} 3450 (broad, –OH), 2930, 2850, 1720 (–CHO), 1680 (unsaturated aldehyde), 1460, 1370, 1070 cm^{-1} ; HRCIMS ($M + \text{NH}_4$)⁺ *m/z* 252.1949 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$, 252.1963).

Compound 3: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ +37.2° (c 0.1, MeOH) (lit.³ $[\alpha]_D^{25}$ +37°); HRCIMS ($M + \text{NH}_4$)⁺ *m/z* 342.2630 (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NO}_4$, 342.2644).

Compound 4: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ –7.2° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 221 nm (log ϵ 3.65); IR (KBr) ν_{max} 2930, 2850, 1780 (unsaturated γ -lactone), 1760, 1210, 1010, 970 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 1 and 2; NOESY correlations H-2ax/Me-13, H-2ax/Me-14, H-5/Me-15, H-6eq/Me-15, H-11/Me-13, Me-13/Me-14; HMBC correlations H-5/C-6, C-9, C-10; H-6eq/C-5, C-7, C-8, C-10; H-7ax/C-6, C-8, C-9; H-7eq/C-5, C-6, C-8, C-9; H-11/C-8, C-12, C-OAc; Me-13/C-1, C-5, C-9,

C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5; Me-15/C-3, C-4, C-5; HRCIMS ($M + \text{NH}_4$)⁺ *m/z* 310.2025 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_4$, 310.2018).

Compound 5: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ –40.1° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 223 nm (log ϵ 3.78); IR (KBr) ν_{max} 2930, 2870, 1770, 1350, 1190, 960 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 1 and 2; NOESY correlations H-1ax/H-9, H-2ax/Me-14, H-3ax/H-5, H-3ax/Me-15, H-5/H-9, H-5/Me-15, H-6ax/Me-14, H-6eq/Me-15, H-11/Me-13; HMBC correlations H-5/C-6, C-9, C-13, C-14, C-15; H-6ax/C-5; H-6eq/C-8, C-10; H-9/C-7, C-10, C-13; H-11/C-9, C-10, C-12, Ac; Me-13/C-1, C-5, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5; Me-15/C-3, C-4, C-5; HRCIMS ($M + \text{NH}_4$)⁺ *m/z* 310.2015 (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_4$, 310.2018).

Compound 6: white solid; mp 75–76 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +14.4° (c 0.3, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 2950, 2860, 1765 (ester), 1460, 1350, 1150, 1090, 990 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 1 and 2; NOESY correlations H-2ax/Me-13, H-2ax/Me-14, H-3ax/Me-15, H-3eq/Me-14, H-3eq/Me-15, H-5/H-9, H-6ax/Me-13, H-6ax/Me-14, H-6eq/Me-15, H-8/Me-13, Me-13/Me-14; HMBC correlations H-2ax/C-1; H-7ax/C-6; H-8/C-12; H-9/C-1, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13; H-12/C-7, C-8, C-9, C-11; Me-13/C-1, C-5, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5, C-14; Me-15/C-3, C-4, C-5, C-15; HREIMS (M)⁺ *m/z* 236.1771 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236.1776).

Compound 7: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ –21.6° (c 0.3, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 2930, 1460, 1370, 1240, 1120, 1050, 990 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 1 and 2; NOESY correlations H-5/H-9, H-6ax/Me-13, H-8/H-12 (δ 3.96), H-11/Me-13, H-11/OMe; H-12 (δ 3.56)/Me-13, Me-13/Me-14; HMBC correlations H-1ax/C-13; H-6ax/C-5; H-9/C-1, C-10, C-11, C-13; H-11/C-8, C-9, C-12, C-OMe; H-12/C-7, C-8, C-9; Me-13/C-1, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-14; Me-15/C-3, C-4, C-5, C-15; OMe/C-11; HREIMS ($M - \text{OCH}_3$)⁺ *m/z* 221.1908 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}$, 221.1905).

Compound 8: colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$ +2.8° (c 0.2, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3450 (broad, –OH), 2930, 2870, 1455, 1380, 1100, 1020 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 1 and 2; NOESY correlations H-1ax/H-9; H-1eq/H-11, H-1eq/Me-13, H-2ax/Me-14, H-5/H-9, H-6ax/H-12, H-6ax/Me-13, H-6ax/Me-14, H-6eq/Me-15, H-11/Me-13, H-11/OMe, H-12/Me-13; HMBC correlations H-5/C-4, C-6, C-7, C-10, C-13; H-7ax/C-6, C-8, C-12; H-7eq/C-5, C-9; H-9/C-1, C-8, C-10, C-11, C-12, C-13; H-11/C-8, C-10, C-12, OMe; H-12/C-8, C-11; Me-13/C-1, C-5, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5, C-15; Me-15/C-3, C-4, C-5, C-14; OMe/C-11; HRCIMS ($M + \text{NH}_4 - \text{H}_2\text{O}$)⁺ *m/z* 284.2217 (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$, 284.2225).

Compound 9: white solid; mp 79–80 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +9.6° (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 294 nm (log ϵ 3.34); IR (KBr) ν_{max} 3500 (broad, –OH), 2930, 2870, 1620 (C=O stretching of β -hydroxy- α,β -unsaturated ketone), 1590, 1460, 1380, 1290, 1200, 940 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 2 and 3; HMBC correlations H-6ax/C-5; H-6eq/C-8; H-7ax/C-6, C-8; H-7eq/C-5, C-6, C-8; H-11/C-8, C-9; Me-13/C-1, C-5, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5, C-15; Me-15/C-3, C-4, C-5, C-14; HREIMS (M)⁺ *m/z* 222.1614 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 222.1619).

Compound 10: white solid; mp 84–85 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +36.0° (c 0.2, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 2950, 2870, 1740, 1370, 1250, 1000 cm^{-1} ; ¹H- and ¹³C-NMR values, see Tables 2 and 3; HMBC correlations H-5/C-4, C-6; H-11/

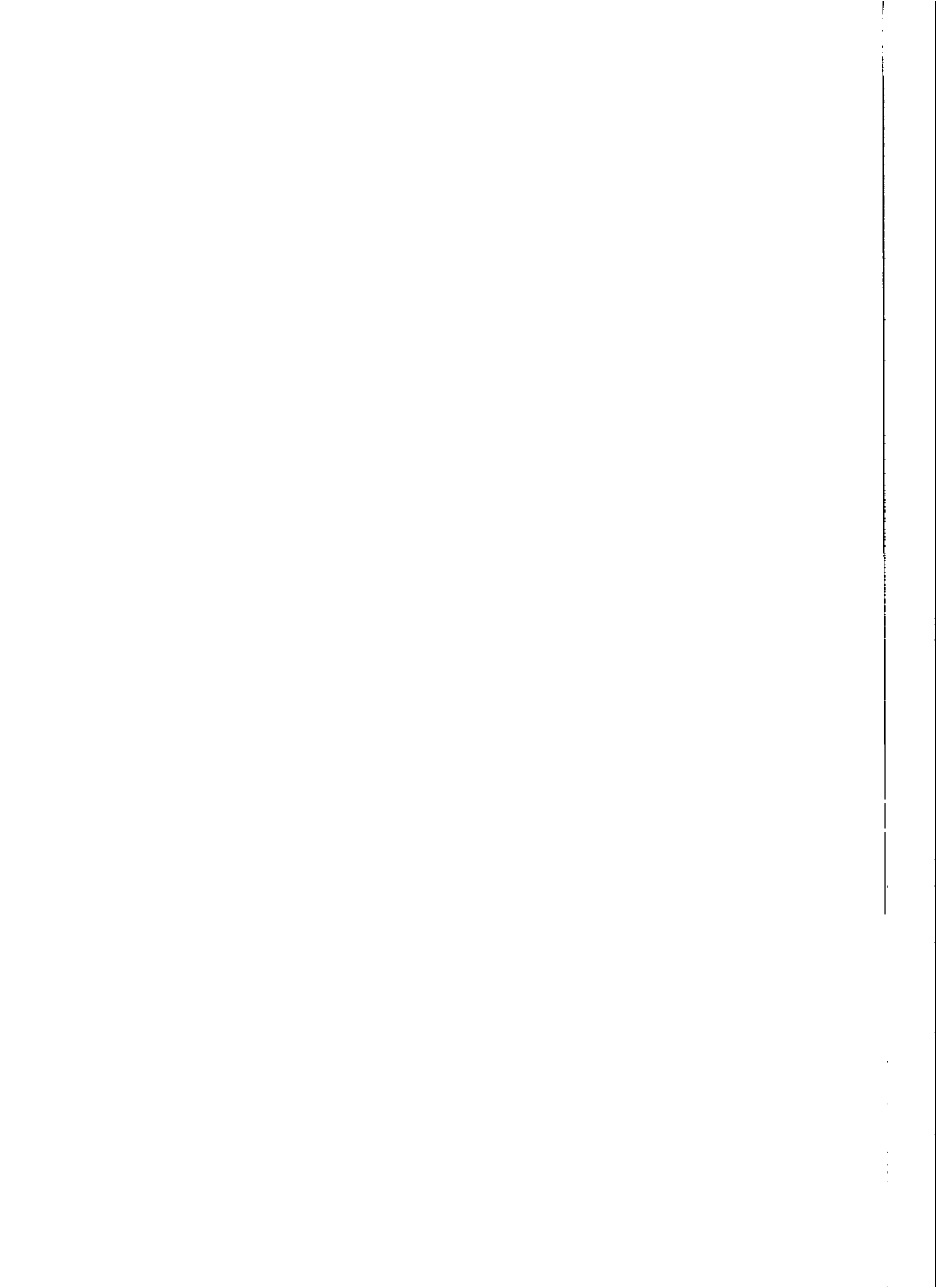
C-8, C-9, 11-OAc; Me-13/C-1, C-5, C-9, C-10; Me-14/C-3, C-4, C-5; Me-15/C-3, C-4, C-5, C-14; HRCIMS (M + NH₄)⁺ m/z 328.2494 (calcd for C₁₈H₃₄NO₄, 328.2487).

Acknowledgment. The authors thank Dr. Michelle Kelly-Borges for her assistance in curating the voucher specimens at the BMNH. Mass spectral data were kindly provided by Drs. Richard Kondrat and Ron New, Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside. Special thanks go to Ms. Young H. Choi and Mr. Wilfred Lumbang for assistance with laboratory work. This research was financially supported by the Korea Ministry of Science and Technology (Grant Nos. BSPE-00601 and BSPN-00332 to J.S.) and by the National Institutes of Health (Grant No. GM 38624 to V.J.P.).

References and Notes

- (1) Jansen, B. M.; de Groot, A. *Nat. Prod. Rep.* 1991, 8, 309-318.
- (2) Garson, M. J.; Dexter, A. F.; Lambert, L. K.; Liokas, V. *J. Nat. Prod.* 1992, 55, 364-367.
- (3) Butler, M. S.; Capon, R. J. *Aust. J. Chem.* 1963, 46, 1256-1267.
- (4) Montagnac, A.; Martin, M.-T.; Debitus, C.; Pais, M. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 866-868.
- (5) Thacker, R. W.; Becerro, M. A.; Lumbang, W. A.; Paul, V. J. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. Manuscript submitted to the journal *Ecology*.
- (6) The voucher specimens are deposited at the British Museum of Natural History and are considered to be chemistry vouchers in the BMNH collection (*Dysidea* sp.: BMNH 1997.5.13.1; order Dendroceratida; family Dysideidae; locality: Sponge Mound, Apra Harbor, Guam; 25 m, collector: V. J. Paul, 22 April 1997).
- (7) Mori, K.; Watanabe, H. *Tetrahedron* 1986, 42, 273-281.
- (8) Avila, C.; Cimino, G.; Crispino, A.; Spinella, A. *Experientia* 1991, 47, 306-310.
- (9) Fukuyama, Y.; Sato, T.; Miura, I.; Asakawa, Y. *Phytochemistry* 1985, 24, 1521-1524.
- (10) Caprioli, V.; Cimino, G.; Colle, R.; Gavagnin, M.; Sodano, G.; Spinella, A. *J. Nat. Prod.* 1987, 50, 146-151.
- (11) Kubo, I.; Lee, Y.-W.; Pettei, M.; Pilkiawicz, F.; Nakanishi, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 1013-1014.
- (12) Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Morrone, R.; Sodano, G. *Tetrahedron* 1985, 41, 1093-1100.
- (13) Barnes, C. S.; Loder, J. W. *Aust. J. Chem.* 1962, 15, 322-327.
- (14) Mori, K.; Watanabe, H. *Tetrahedron* 1986, 42, 273-281.

NP9703297



REPRINTED FROM

BULLETIN

OF THE

KOREAN CHEMICAL SOCIETY

VOL. 18, NO. 6, JUNE 1997

THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY

Isolation of Epidioxysteroids from a Sponge of the Genus *Tethya*

Youngwan Seo, Jung-Rae Rho, Ki Woong Cho, Chung J. Sim¹, and Jongheon Shin*

*Marine Natural Products Chemistry Laboratory, Korea Ocean Research & Development Institute
Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea*

¹*Department of Biology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea*

Received March 15, 1997

Four steroids including two novel compounds have been isolated from a sponge of the genus *Tethya*. All of the compounds possess a 5 α ,8 α -epidioxy functionality as a common structural feature. Two new steroids, 1 and 2, possess a cyclopropyl ring at C-24(26) of the side chain. The structures of these compounds have been determined by combined spectroscopic methods.

Introduction

Sponges (phylum Porifera) are widely recognized as the most prolific sources of both structurally unique and biologically active marine natural products.¹ In a recent literature survey conducted by this group, more than 40% of mar-

ine originated metabolites have been isolated from these animals.² Metabolites of sponges are consisting of compounds originated from various biogenetic origins; steroids, terpenoids, peptides, polyketides, purines and pyrimidines, and mixed biosynthetic products.^{1,3} In addition, numerous compounds have been reported to exhibit potent and diverse

bioactivities. Consequently, several leading compounds on the development of new drugs from marine sources have been derived from these animals.⁴⁻⁶ In Korean water, sponges are also among the most abundant benthic colonial animals. However, chemistry of these organisms have attracted very little attention.

Steroids are among the major groups of sponge metabolites. As in the cases of metabolites of other structural classes, numerous steroids possessing unprecedented carbon skeletons and functionalities have been isolated from these animals.^{1,7,8} In addition, several sponge-derived steroids have been reported to exhibit cytotoxic, antiviral, antimicrobial, and enzyme-inhibitory activities. As a part of our search for novel substances from benthic organisms of the Korean water, we collected a sponge of the genus *Tethya* off the shore of Keomun Island.⁹ Silica vacuum flash chromatography of the crude extract followed by silica and reversed-phase HPLC has yielded several steroids possessing the 5 α ,8 α -epidioxy functionality as a common structural feature. Herein we report the structures of four compounds (1-4) including two novel ones bearing an unusual cyclopropyl ring at the side chain. All of protons and carbons of these compounds were also assigned on the basis of 2-D NMR experiments.

Results and Discussion

Compound 1 was isolated as a white amorphous solid. The molecular formula of C₂₇H₄₄O₃ was deduced by a combination of high resolution mass and ¹³C NMR spectrometry. A strong absorption band at 3400 cm⁻¹ in the IR spectrum indicated the presence of a hydroxyl group(s). Characteristic signals of a 3-hydroxysterol were observed at δ 4.01 (1H, m, H-3) and 0.72 (3H, s, H-18) in the ¹H NMR spectrum. Since 27 carbon signals were observed in the ¹³C NMR spectrum, 1 was thought to be a sterol of the cholestane class.

Careful examination of the NMR data revealed several structural features. The ¹³C NMR spectrum showed carbon signals of a di- and a tri-substituted double bond at δ 142.38 (C), 135.39 (CH), 130.76 (CH), and 119.80 (CH). Downfield signals at δ 6.60 (1H, d, $J=8.8$ Hz), and 6.29 (1H, d, $J=8.8$ Hz) in the ¹H NMR spectrum revealed that the disubstituted double bond was indeed an isolated one. Although there are several positions, e.g. C-4, C-5, and C-22, possible for a double bond in the framework of steroids, the chemical shifts and coupling modes of these protons were indicative of the presence of C-6 double bond with a 5,8-epidioxy functionality. The location of a trisubstituted double bond was assigned to C-9(11) since the C-9 carbon, frequently observed in the region of δ 60-50 in common steroids, was not found in the ¹³C NMR spectrum of 1. In addition, carbon signals at δ 20.17 (CH), 12.98 (CH), and 12.68 (CH₂) and corresponding proton signals at δ 0.40 (1H, m), 0.30 (1H, m), and 0.03 (2H, m) in the NMR data revealed the presence of a disubstituted cyclopropyl ring. Observation of four methyl carbons, instead of five or more methyls of common steroids, in the ¹³C NMR spectrum revealed that one of the methyls of cholestane skeleton must be converted to a methylene forming a cyclopropane moiety.

Based on these interpretations, the structure of 1 was determined by a combination of 2-D NMR methods. All of the

proton-bearing carbons and their protons were precisely matched by a HMQC experiment (Table 1). Tracing of the proton spin-couplings by the ¹H COSY data, initiated from the H-3 proton, readily determined that 1 possessed the same A ring as cholesterol. Since the H-4 protons at δ 2.12 (1H, ddd, $J=13.7, 5.2, 1.7$ Hz) and 1.92 (1H, dd, $J=13.7, 11.7$ Hz) were not coupled with any of the olefinic protons, the adjacent C-5 carbon must be oxidized. In the same manner, a combination of the ¹H COSY and HMQC experiments allowed the assignment of a spin system including the H-21 methyl protons at δ 0.88 (3H, d, $J=5.9$ Hz) and the cyclopropyl protons suggesting the C-26 methyl group to be converted to a methylene. Thus, the structure of 1 was defined as a 5,8-epidioxysteroid possessing two double bonds at C-6 and C-9(11) and a cyclopropyl ring at C-24(26).

The structure of 1 was confirmed by a HMBC experiment (Table 1). Several long-range couplings were observed between the key protons and their adjacent carbons. In particular, the presence of a 5,8-epidioxy group was confirmed by couplings between the H-2, H-6, and H-7 protons and the C-5 and C-8 carbons. Couplings between the H-11 proton and C-8 and C-10 carbons assigned the C-9(11) double bond. Similarly the presence of a cyclopropane ring at C-24(26) was confirmed by long-range correlations between the H-27 methyl protons and C-24, C-25, and C-26 carbons.

Compound 1 possessed asymmetric carbon centers at C-5, C-8, C-24, and C-25 which are uncommon among steroids. Stereochemistry of the cyclopropyl centers at C-24 and C-25 was determined by a combination of proton-decoupling and NOEDS experiments. Signals of the H-24 and H-25 protons were changed from multiplets to double-double-doublets ($J=8.3, 4.4, 4.4$ Hz for both) by irradiations of the H-23 and H-27 protons, respectively. The small coupling between the adjacent protons ($J_{24,25}=4.4$ Hz) assigned trans orientation for the C-24(26) cyclopropane ring. This interpretation was supported by a NOEDS experiment in which irradiation of the H-27 protons at δ 1.00 significantly enhanced the signal of the H-24 proton at δ 0.30. Thus, the relative configurations of the cyclopropyl centers were determined as 24R*,25R*. Due to the spatial distance between the cyclopropane and D ring of steroidal nucleus, however, the absolute configurations of these centers were unable to be assigned.¹⁰

The stereochemistry of the epidioxy centers at C-5 and C-8 could be either 5 α ,8 α - or 5 β ,8 β -. Since the C-5 and C-8 carbons did not contain any protons, the stereochemistries of these centers were assigned by the chemical shifts of the adjacent protons. Chemical shifts of the H-6, H-7, H-18, and H-19 protons which would be influenced by the orientation of the epidioxy group were found at δ 6.29, 6.60, 0.72, and 1.09, respectively. A literature survey revealed that these values were very similar to those of the same protons reported as δ 6.30, 6.61, 0.74, and 1.01, respectively, of a structurally related 5 α ,8 α -epidioxysteroid recently isolated from the plant *Typha latifolia*.¹¹ Therefore, the configurations of these centers were inferred as 5 α ,8 α -, as further discussed later. Thus, the structure of compound 1 was determined as 5 α ,8 α -epidioxy-24(26)-cyclopropylcholesta-6,9(11)-dien-3 β -ol.

A closely related compound 2 was isolated as a white solid which was analyzed for C₂₇H₄₂O₃ by a combination of

Table 1. NMR assignments for compounds **1** and **2**

no	1			2		
	H ^a	C ^a	HMBC ^c	H ^a	C ^a	HMBC ^c
1	2.09 (m)	32.54		1.95 (m)	34.70	
2	1.67 (ddd, 13.7, 3.4, 3.4)	30.59		1.69 (ddd, 13.7, 3.4, 3.4)	30.13	
3	1.94 (m)	66.33		1.84 (br dd, 12.7, 2.5)	66.46	
4	1.56 (m)	36.05	2, 3, 5, 10	1.55 (m)	36.95	2, 3, 5, 10
5	4.01 (m)	82.70		3.97 (m)	82.13	
6	2.12 (ddd, 13.7, 5.2, 1.7)	135.39	5, 8	2.11 (br dd, 13.7, 3.4)	135.32	5, 8, 10
7	1.92 (dd, 13.7, 11.7)	130.76	5, 8	6.51 (d, 8.8)	130.71	5, 8
8		78.36			79.43	
9		142.38		1.49 (m)	51.04	
10		37.91			36.93	
11	5.42 (dd, 6.3, 2.0)	119.80	8, 10, 13	1.49 (m)	23.43	
12	2.27 (dd, 17.1, 5.9)	41.26	9, 11, 13, 14, 18	1.20 (m)	39.42	
13	2.05 (br d, 17.1)	43.77		1.98 (m)	44.73	
14		48.01	7, 8, 13, 18	1.20 (m)	51.57	7, 8, 13, 18
15	1.82 (dd, 12.2, 7.8)	20.88		1.58 (m)	20.65	13, 14
16	1.71 (m)	28.10		1.63 (m)	28.26	
17	1.60 (m)	55.99		1.43 (m)	56.35	
18	1.97 (m)	12.75	12, 13, 14, 17	1.93 (m)	12.72	12, 13, 14,
19	1.43 (m)	25.53	1, 5, 9, 10	1.39 (m)	18.59	1, 5, 9, 10
20	1.31 (m)	34.92		0.88 (s)	34.83	
21	0.72 (s)	18.39	17, 22	1.39 (m)	18.20	17, 22
22	1.09 (s)	35.52		0.87 (d, 6.1)	35.55	
23	1.43 (m)	30.59		1.49 (m)	30.64	
24	0.30 (m)	20.17		1.11 (m)	20.22	
25	0.40 (m)	12.93		1.15 (m)	12.97	
26	0.03 (m)	12.68		0.29 (m)	12.65	23, 24, 27
				0.39 (m)		
				0.11 (m)		

^a measured in CDCl₃ solutions at 125 and 500 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H COSY, TOCSY, HMQC, and DEPT experiments. ^c Positions of correlated carbons. Parameters were optimized for 8 Hz of coupling constants.

high-resolution mass and ¹³C NMR spectrometry. The NMR data of this compound were very similar to those obtained for **1**. The only significant difference in the ¹³C NMR spectrum was the replacement of the C-9 and C-11 olefinic carbons of **1** by upfield signals. Corresponding difference was also observed in the ¹H NMR spectrum in which the signal of the H-9 olefinic proton of **1** disappeared. Therefore, compound **2** was defined as the 9,11-dihydro derivative of **1** that was confirmed by a combination of the ¹H and ¹³C NMR, ¹H COSY, HMQC, and HMBC experiments (Table 1).

Compound **2** possessed all of the asymmetric carbon centers (C-5, C-8, C-24, and C-25) of **1**. By utilizing the same proton-decoupling and NOEDS experiments as **1**, the configurations of the cyclopropyl centers were assigned as 24*R*⁺, 25*R*⁺. Stereochemistry of the epidioxy centers at C-5 and C-8 was approached by the chemical shifts of the adjacent protons. A literature survey revealed that the chemical shifts of

the H-6, H-7, H-18, and H-19 protons were significantly influenced by the stereochemistry at C-5 and C-8.¹¹ That is, the orientations of oxygens attached to the epidioxy centers influence the chemical shifts of the H-18 and H-19 methyl protons which in turn would change those of the H-6 and H-7 olefinic protons. In the case of a 5β,8β-epidioxy, due to the spatial proximity with oxygens, the H-18 and H-19 methyl protons would be shifted downfield. In contrast, the H-6 and H-7 protons would be shifted upfield because the interactions with the H-18 and H-19 methyls disappeared. This phenomenon would be reversed in a 5α,8α-epidioxy in that the olefinic protons would be shifted downfield by the spatial proximity with the methyl protons which were shifted upfield by the disappearance of the interaction with the oxygens. As a result, the chemical shifts of the H-6, H-7, H-18, and H-19 protons in a 5α,8α-epidioxy were observed at δ 6.25, 6.51, 0.82, and 0.89, respectively, while signals of the same protons were found at δ 5.57, 5.89, 1.18,

and 0.93, respectively, in the corresponding 5 β ,8 β epidioxide.¹¹ Since the chemical shifts of the same protons of **2** were found at δ 6.24, 6.51, 0.80, and 0.88, respectively, which were very similar to those observed for the 5 α ,8 α -epidioxide, stereochemistry of **2** was assigned as 5 α ,8 α . Thus, the structure of compound **2** was defined as 5 α ,8 α -epidioxy-24(26)-cyclopropylcholesta-6-en-3 β -ol.

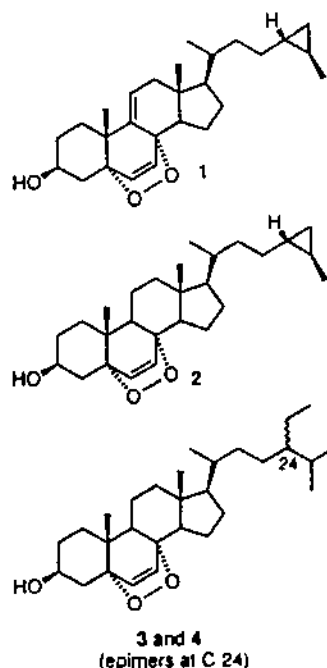
In addition to these compounds, two epimeric steroids (**3** and **4**) were isolated as a mixture. The molecular formula of a white solid isolated by silica and reversed-phase HPLC was defined as C₂₉H₄₄O₃ by high-resolution mass data. However, ¹³C NMR spectrum of this material showed 41 instead of the expected 29 carbon signals suggesting that this material was indeed a mixture of two compounds. Since all of the efforts to separate these compounds by chromatographic techniques did not succeed, however, the structural elucidation was made to the mixture. Comparison of the ¹³C NMR data revealed that most of carbon signals corresponding to the A-C rings of **2** were also present in the mixture. Moreover, the intensities of these signals were much stronger than those of other carbons. Therefore, the mixture was thought to be composed of two compounds whose structural differences must exist only at the side chain.

A combination of ¹H COSY and HMQC experiments of the mixture revealed that the cyclopropyl moiety of **2** was converted to an isopropyl group. In addition, a new ethyl group was attached to the C-24 carbon. Therefore, these compounds were defined as 5 α ,8 α -epidioxysteroids of the stigmaterol class of which structural difference was present in the stereochemistry of C-24, the only asymmetric carbon center at the side chain. This interpretation was supported by the ¹³C NMR data. Differences between chemical shifts of pairing carbons were generally larger for those located at C-24 and vicinity (for carbons at C-23-C-29, $\Delta\delta$ 0.06-0.35 ppm) than other carbons (for carbons at C17 and C-20-C-22, $\Delta\delta$ 0-0.12 ppm). Thus, the structures of these compounds (**3** and **4**) were defined as 24*R* and 24*S* isomers of 5 α ,8 α -epidioxystigmasta-5-en-3 β -ol. A literature survey revealed that these steroids have been isolated as metabolites of several marine animals such as the coelenterates *Dendrogyra cylindrus* and *Metridium senile*, the mollusc *Aplysia dactylomela*, the sponges *Suberites carnosus* and *Thalysias juniperina*, and the tunicate *Ascidia nigra*.¹²⁻¹⁴ However, signals of the methyl protons at the side chain were not separated enough to assign the stereochemistry of the C-24 asymmetric center. Based on the intensity of the H-21 methyl protons at δ 0.90 and 0.89, the relative intensities between the epimers, **3** and **4** were estimated as 3:2.

Epidioxysteroids have been isolated from various natural sources in marine environment, these compounds have been frequently isolated from invertebrates.¹²⁻¹⁶ To the best of our knowledge, however, the C-24(26) cyclopropyl-containing side chain of **1** and **2** is an unprecedented one among the natural epidioxysteroids.

Experimental

General. NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions on a Varian Unity-500 spectrometer. Proton and carbon NMR spectra were measured at 500 and 125 MHz,



respectively. All chemical shifts were recorded with respect to internal Me₄Si. IR spectra were recorded on a Mattson GALAXY spectrophotometer. Mass measurements were provided by the Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside. Melting points were measured on a Fisher-Jones Apparatus and are reported uncorrected. All solvents used were spectral grade or were distilled from glass prior to use.

Collection, extraction, and isolation. *Tethya* sp. (sample number 94K-31) was collected by hand using SCUBA at 20-25 m depth in November, 1994, along the shore of Keomun Island.⁹ The collected specimens were immediately frozen by dry ice and sent to the laboratory. The lyophilized animals (0.28 kg) were repeatedly extracted with CH₂Cl₂ (1 L × 2) and MeOH (1 L × 2) and dried under vacuum to yield dark brown syrup (11.23 g). The crude extract was partitioned between hexane (500 mL) and 10% aqueous methanol (500 mL). The hexane layer was dried (2.87 g) and separated by silica vacuum flash chromatography (10 cm × 7 cm, 60PF₂₃₄) by using sequential mixtures of *n*-hexane and EtOAc as eluents. The fractions eluted with moderately polar solvents (20-40 % EtOAc in hexane) were combined and dried under vacuum to yield a pale yellow solid (0.87 g). This material was redissolved in 30% EtOAc in hexane and filtered through a silica Sepak column. The filtrate was subjected to semi-preparative HPLC (YMC silica column, 1 cm × 25 cm, 30% EtOAc in hexane) to yield epidioxysteroids. Final purification was made by reversed-phase HPLC (Shiseido Capcell ODS column, 20% MeOH in CH₃CN) to give pure compounds; 12.7, 49.2, and 16.5 mg for **1-3**, respectively.

Compound 1. a white amorphous solid, mp 89-90 °C; IR (KBr) ν_{max} 3400, 2950, 2920, 2860, 1460, 1380, 1080, 1030, 970 cm⁻¹; HREIMS [M]⁺ obsd 412.2971; calculated for C₂₇H₄₀O₃, 412.2977; LRMS m/z (relative intensity) 412 (17), 396 (22), 380 (70), 362 (59), 285 (23), 251 (23), 209

(16), 152 (25), 55 (100).

Compound 2. a white amorphous solid, mp 114-115 °C; IR (KBr) ν_{max} 3400-3300 (broad), 2950, 2860, 1470, 1450, 1380, 1080, 1040 cm^{-1} ; HREIMS [M]⁺ obsd 414.3133; calculated for C₇H₄O₃, 414.3134; LRMS m/z (relative intensity) 414 (22), 398 (29), 382 (22), 362 (13), 267 (12), 219 (13), 152 (67), 135 (23), 44 (100).

Compound 3 and 4. a white amorphous solid; HRCIMS [M+H]⁺ obsd 445.3610; calculated for C₂₇H₄₄O₈, 445.3681; ¹H NMR (CDCl₃), key protons of the major diastereomer δ 6.48 (1H, d, J=8.7 Hz, H-7), 6.22 (1H, d, J=8.7 Hz, H-6), 3.95 (1H, m, H-3), 2.09 (1H, br dd, J=13.8, 3.9 Hz, H-4), 0.89 (3H, d, J=6.3 Hz, H-21), 0.86 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, t, J=7.3 Hz, H-29), 0.80 (3H, d, J=6.3 Hz, H-26), 0.79 (3H, d, J=6.8 Hz, H-27), 0.78 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃), numbers in parenthesis are chemical shifts of the minor diastereomer δ 135.34 (CH, C-6), 130.72 (CH, C-7), 82.13 (C, C-5), 79.44 (C, C-8), 66.47 (CH, C-3), 56.31[†] (56.33, CH, C-17), 51.59 (CH, C-14), 51.07 (CH, C-9), 45.81 (46.03, CH, C-24), 44.75 (C, C-13), 39.44 (CH₂, C-12), 36.97 (C, C-10), 36.95 (CH₂, C-4), 35.62 (35.74, CH, C-20), 34.72 (CH₂, C-1), 33.75 (33.72, CH₂, C-22), 30.15 (CH₂, C-2), 29.17 (28.96, CH, C-25), 28.29 (CH₂, C-16), 26.10 (26.39, CH₂, C-28), 23.44 (CH₂, C-11), 23.08 (23.02, CH₂, C-23), 20.67 (CH₂, C-15), 19.85 (19.62, CH₃, C-26), 19.06 (18.99, CH₃, C-27), 18.67 (18.72, CH₃, C-19), 18.20 (CH₃, C-21), 12.66 (CH₃, C-18), 12.00 (12.35, CH₃, C-29).

Acknowledgment. We thank Mr. Hosung Chung, Polar Research Center, KORDI, for assistance of collecting gorgonian samples. Mass spectral data were kindly provided by Dr. Richard Kondrat, Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside. Special thanks go to Ms. Eunjoo Back for assistance of laboratory work. This research was financially supported by Ministry of Science and Technology Grant BSPN-00300 and -00332

References

1. Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* 1996, 13, 75-125 and

references cited therein.

2. In our survey of Chemical Abstracts, 710 of 1610 papers on marine natural products published during the period of 1991-1996 are those concerning sponge metabolites.
3. Ireland, C. M.; Roll, D. M.; Molinski, T. F.; McKee, T. C.; Zabriskie, T. M.; Swersey, J. C. In *Biomedical Importances of Marine Organisms*; Fautin, D. G. Ed. California Academy of Sciences: San Francisco, 1988. pp 41-59.
4. Munro, M. H. G.; Luibrand, R. T.; Blunt, J. W. In *Bioorganic Marine Chemistry*; Scheuer, P. J. Ed. Vol 1, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1987, pp 93-177.
5. Attaway, D. H.; Zaborsky, O. R. Eds. *Marine Biotechnology*; Plenum Press, New York, 1993.
6. Flam, F. *Science* 1994, 266, 1324-1325.
7. D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* 1993, 93, 1839-1895.
8. Giner, J.-L. *Chem. Rev.* 1993, 93, 1735-1752.
9. The voucher specimens under the code name 94K-31 are on deposit in the octocorallian collection, Natural History Museum, Han Nam University, under the curatorship of C. J. S.
10. Kobayashi, J.; Ishida, K.; Naitoh, K.; Shigemori, H.; Mikami, Y.; Sasaki, T. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 1350-1355.
11. Greca, M. D.; Mangoni, L.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtera, L. *Gazz. Chim. Ital.* 1990, 120, 391-392.
12. Gunatilaka, A. A. L.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J., Djerassi, C. *J. Org. Chem.* 1981, 46, 2860-2866.
13. Findlay, J. A.; Patil, A. D. *Steroids* 1984, 44, 261-265.
14. Mishra, P. D.; Wahidulla, S.; D'Souza, L.; Kamat, S. Y. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* 1996, 35B, 806-809.
15. Iguchi, K.; Shimura, H.; Yang, Z.; Yamada, Y. *Steroids* 1993, 58, 410-413.
16. Anjaneyulu, A. S. R.; Sagar, K. S.; Venugopal, M. J. R. V. *Tetrahedron* 1995, 51, 10997-11010.



Pergamon

Tetrahedron 54 (1998) 447-462

TETRAHEDRON

Petrocortynes and Petrosiacetylenes, Novel Polyacetylenes from a Sponge of the Genus *Petrosia*

Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Jung-Rae Rho, and Jongheon Shin*

Marine Natural Products Chemistry Laboratory
Korea Ocean Research & Development Institute
Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea

Chung J. Sim

Department of Biology, Han Nam University
Taejeon 300-791, Korea

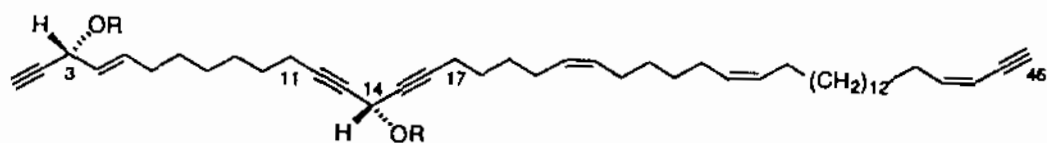
Received 10 September 1997; accepted 27 October 1997

Abstract: Petrocortynes A-C (1-3) and petrosiacetylenes A-D (4-7), novel long-chain polyacetylenes and related metabolites have been isolated from a sponge of the genus *Petrosia*. Compounds 1 and 2 are C₄₆ linear tetraacetylenes structurally related to petroformynes while 3 possesses an unusual γ -pyrone ring formed by an oxidative cyclization of a diacetylenic carbinol functionality. Compounds 4-7 are highly symmetric C₃₀ linear polyacetylenes in that 6 and 7 were isolated as unseparable mixtures of diastereomers. The structures of these compounds have been elucidated by combined chemical and spectral methods. Absolute stereochemistry has been determined by the modified Mosher's method. These compounds exhibited significant brine-shrimp lethality, RNA-cleaving activity, and/or moderate inhibitory activity against PLA₂ and Na⁺/K⁺ ATPase.

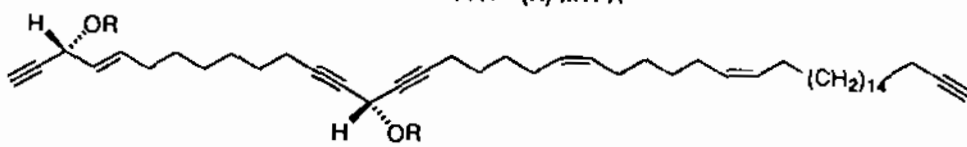
© 1997 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Long-chain acetylenes and polyacetylenes are widely recognized as a representative group of sponge metabolites. Possessing the great structural diversity on both chain-lengths and functionalities, compounds of this structural class have been frequently isolated from sponges of the genera *Adocia*, *Cribrochalina*, *Pakellia*, *Petrocia*, *Reniera*, *Siphonocholina*, and *Xestospongia*.¹ Several polyacetylenes have been reported to exhibit potent antimicrobial, cytotoxic, antitumor, antiviral, and enzyme-inhibitory activities as well as brine-shrimp lethality.¹⁻¹² In addition, some of these compounds exhibited important ecological roles including metamorphosis-inducing and antifouling effects against larvae of ascidian and barnacle, respectively, and inhibitory activity of fertilization of starfish gametes.^{13,14}

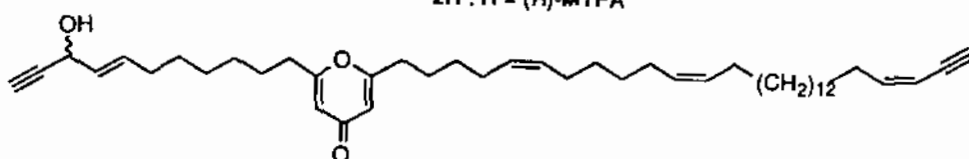
In our search for bioactive substances from Korean water organisms, we encountered a sponge of the genus *Petrosia* whose crude organic extract exhibited moderate toxicity (LD₅₀ 220 ppm) against brine-shrimp larvae.¹⁵ Bioassay-guided partitioning and vacuum flash chromatography of the crude extract followed by silica and reversed-phase HPLC yielded several long-chain polyacetylenes. In this paper, we wish to report the structure elucidations and bioactivities of petrocortynes A-C (1-3) and petrosiacetylenes A-D (4-7), seven new metabolites of two distinct structural types. Petrocortynes A and B are C₄₆ linear tetraacetylenes structurally related to petroformynes isolated from the Mediterranean sponge *P. ficiformis*.^{11,12,16,17} However, the structures of these compounds are distinguished from each other on the location of a diacetylenic carbinol functionality as well as the stereochemistry of asymmetric carbon centers. Petrocortyne C possesses an unusual γ -pyrone ring formed by an oxidative cyclization of the diacetylenic carbinol group of corticacetylene A.



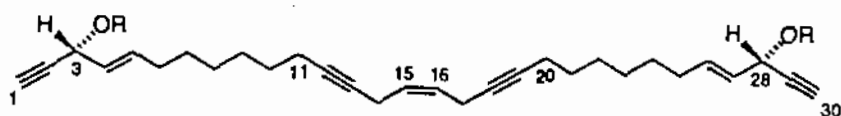
1 : R = H
 1S : R = (S)-MTPA
 1R : R = (R)-MTPA



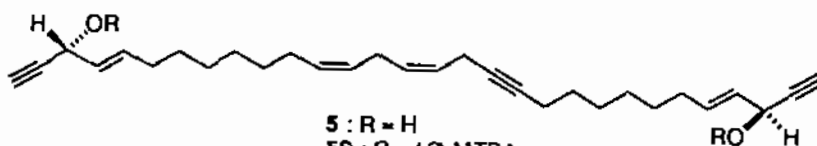
2 : R = H
 2S : R = (S)-MTPA
 2R : R = (R)-MTPA



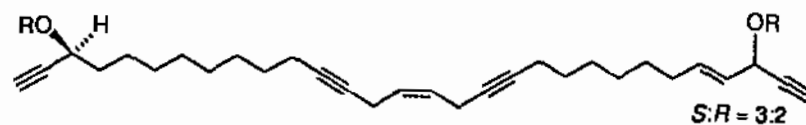
3



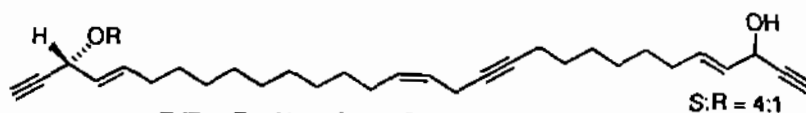
4 : R = H
 4S : R = (S)-MTPA
 4R : R = (R)-MTPA
 4X : R = (S)-2-methylbutyrate



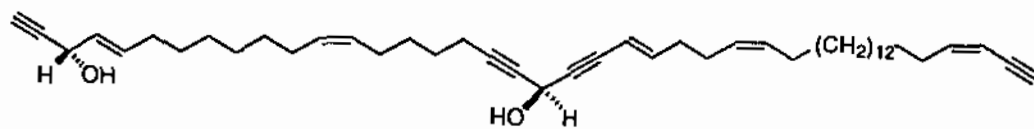
5 : R = H
 5S : R = (S)-MTPA
 5R : R = (R)-MTPA



6 (6a : R = H, 28S; 6b : R = H, 28R)
 6aS : R = (S)-MTPA, 28S; 6bS : R = (S)-MTPA, 28S
 6aR : R = (R)-MTPA, 28R; 6bR : R = (R)-MTPA, 28R



7 (7a : R = H, 28S; 7b : R = H, 28R)
 7aS : R = (S)-MTPA, 28S; 7bS : R = (S)-MTPA, 28S
 7aR : R = (R)-MTPA, 28R; 7bR : R = (R)-MTPA, 28R



8

Petrosiacetylenes A-D are highly symmetric C₃₀ linear polyacetylenes. In contrast to the other sponge-derived C₃₀ linear polyacetylenes, however, petrosiacetylenes C and D were present as mixtures of unseparable stereoisomers which were unveiled only during the stereochemical studies based on the modified Mosher's method.^{7,9,18} These compounds exhibited significant brine-shrimp lethality, RNA-cleaving activity, and/or moderate inhibitory activities against PLA₂ and Na⁺/K⁺ ATPase.

Petrocortyne A (**1**) was isolated as a colorless gum which analyzed for C₄₆H₇₀O₂ by a combination of high-resolution mass and ¹³C NMR analysis. The presence of four acetylenic groups was readily recognized by characteristic carbon signals in the region of δ 90 - 75 in the ¹³C NMR spectrum and absorption bands at 3310, 2250, and 2100 cm⁻¹ in the IR spectrum. Several partial structures were determined by a combination of ¹H NMR, ¹H COSY, HETCOR, HMQC, and HMBC experiments (Figure 1). The ¹H COSY data revealed that none of the partial structures were directly connected to each other. Since **1** possessed several aliphatic methylenes, the partial structures were considered to be linked to each other by linear alkyl chains.

The lengths of alkyl chains and connectivities of partial structures were determined by a combination of chemical degradation, NMR experiments, and mass analysis. Ozonolysis of **1** followed by esterification with methanol under acidic condition yielded dimethyl esters of dibasic carboxylic acids. GC analysis revealed that these were those of adipic (C₆), suberic (C₈), and hexadecanedioic (C₁₆) acids. Since the peak area of dimethyl adipate was much larger (1.61 times) than that of dimethyl suberate, it was believed that **1** possessed linear chains composed of two 4-, one 6-, and one 14-methylene carbons, respectively. Careful examination of the ¹H COSY and TOCSY data revealed that the partial structure **a** was connected to **d** via a -CH₂CH₂- unit.

The TOCSY data obtained by using parameters of various mixing times showed that terminal methylene protons of **a-d** were correlated with several upfield protons through relayed coherence transfer. The most upfield signals correlated with these protons were observed at δ 1.32, 1.32, 1.25, and 1.35 for **a-d**, respectively. It is well known that, in the ¹H NMR spectrum of a linear molecule, deshielding effect of a substituent diminishes as the distance between it and a proton increases.¹⁹ Since the TOCSY correlations of the allylic protons of **c** reached to signals at δ 1.25, almost identical with the chemical shift of methylene protons in long-chain hydrocarbons, the terminal methylene of this partial structure must correspond to an end of a long chain, that is the C₁₄ chain, while those of **a** and **b** were connected to the shorter C₄ and/or C₆ chains. Due to the severe overlapping of upfield proton signals, however, the connectivities of these partial structures were not determined by direct NMR analysis.

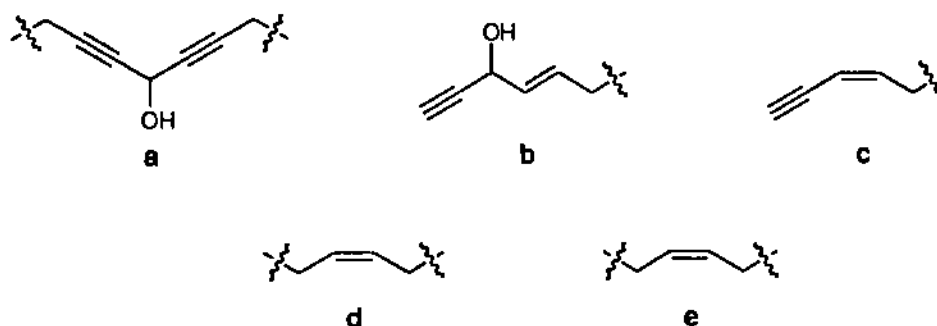


Figure 1. Partial structures of petrocortyne A(**1**).

This problem was solved by lanthanide-induced NMR signal-shifting experiments. Addition of $\text{Eu}(\text{fod})_3$ in a CDCl_3 solution of **1** significantly shifted downfield signals of protons adjacent to the hydroxyl groups while those of other protons were almost unchanged. TOCSY experiments of this mixture showed that signals of the terminal methylene protons of a and b, observed at δ 2.27 and 2.11, respectively, were coupled with those of the identical methylene protons at δ 1.54, 1.43, 1.39, and 1.34. Accordingly these partial structures were connected to each other by a $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ unit, thus forming a C_6 chain. Since the connectivities of three of four alkyl chains of **1** were confidently determined, the remaining $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ unit must be located between d and e, forming a C_4 chain.

The structural interpretation of **1** based on NMR experiments and ozonolysis was confirmed by mass analysis. EIMS data of **1** showed several conspicuous fragments containing linear alkyl chains (Figure 2). Fragments observed at m/z 407 (relative intensity, 11) and 273 (20) were indicative of the location of the C_{14} chain. Similarly those observed at m/z 435 (15) and 355 (43) revealed the locations of the C_4 chains while a fragment found at m/z 503 (5) revealed that of the C_6 chain. Thus, the planar structure of petrocortyne A was unambiguously determined as a C_{46} linear tetraacetylene.

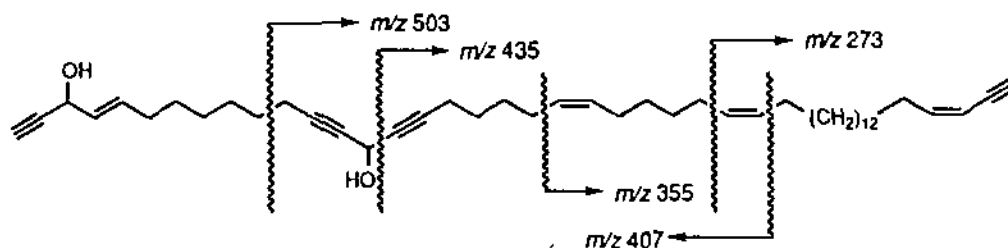


Figure 2. Mass fragmentation of petrocortyne A(1).

Petrocortyne A (**1**) possessed four double bonds (C-4, C-21, C-27, C-43) and two asymmetric carbon centers (C-3, C-14). Based on the coupling constants between the olefinic protons ($J_{4,5} = 15.6$ Hz, $J_{43,44} = 10.7$ Hz), the geometry of double bonds at C-4 and C-43 was assigned as *E* and *Z*, respectively. The geometry of those at C-21 and C-27 were unable to be determined, however, since signals of the olefinic protons were overlapped to each other. Consequently the geometry of these double bonds was assigned as *Z* for both on the basis of chemical shifts of allylic carbons in the ^{13}C NMR spectrum; δ 27.25 (C-26/-29), 27.15 (C-26/-29), 27.11 (C-23), 26.68 (C-20).²⁰

The absolute stereochemistry of the asymmetric centers at C-3 and C-14 was determined by the Kusumi and Kakisawa modification of Mosher's method.^{21,22} Treatment of **1** with (*S*)- and (*R*)-MTPA chloride in pyridine gave the corresponding diesters **1S** and **1R**, respectively. All of the key protons of both compounds were unambiguously assigned by a combination of ^1H NMR, ^1H COSY, and TOCSY data. The absolute configurations were assigned as *3R*, *14R* by $\Delta(\delta_{1S}-\delta_{1R})$ values for protons adjacent to the ester groups (Figure 3). Thus, the structure of petrocortyne A was determined as a C_{46} linear tetraacetylenic diol. A literature survey revealed that petrocortyne A was structurally closely related to petroformynes isolated from the Mediterranean sponge *P. ficiformis*. Besides a double bond adjacent to the diacetylenic carbinol group, petroformyne **4** (**8**) in particular possessed the same functional groups as **1**. However, the structures of these compounds were distinct from each other on exchanging the locations of partial structures a and d in Figure 1.

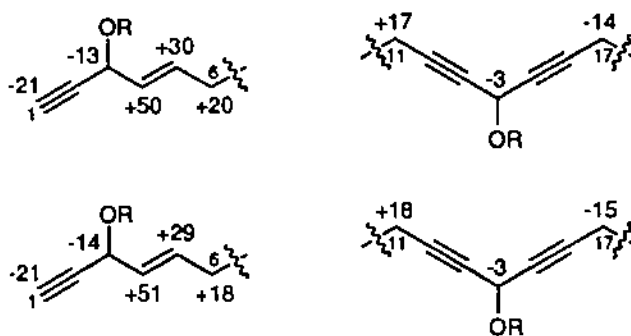


Figure 3. Selected $\Delta(\delta_S - \delta_R)$ of MTPA esters of **1**(top) and **2**(bottom)

In addition, the absolute configurations of asymmetric carbon centers were opposite from each other.

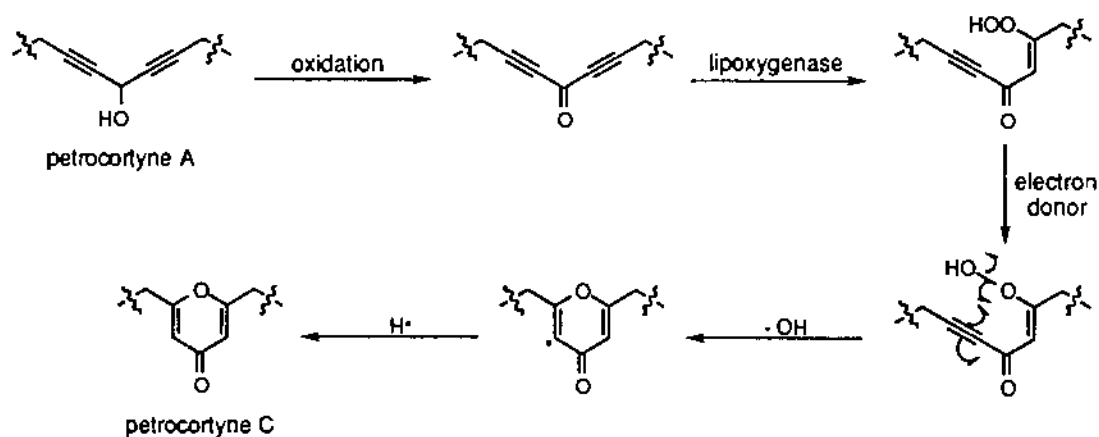
A closely related metabolite, petrocortyne B (**2**) was isolated as a colorless gum. The molecular formula of this compound was deduced as $C_{46}H_{72}O_2$ by combined high-resolution mass and ^{13}C NMR spectrometry. NMR data for this compound were very similar to those derived from **1**, with the replacement of carbons and protons at C-43 and C-44 by upfield signals as the only difference, suggesting **2** to be the 43,44-dihydro derivative of **1**. This interpretation was supported by a mass analysis. Although all of the fragments were not confidently analyzed, EIMS of **2** showed several fragments which were larger than the corresponding ones of **1** by a mass unit of 2 (Experimental Section). Confirmation of this interpretation as well as NMR assignments of key protons and carbons of **2** were established by a combination of the 1H COSY, TOCSY, HMQC, and HMBC experiments. Stereochemistry of **2** was also determined by an application of the modified Mosher's method. Since the $\Delta(\delta_{2S} - \delta_{2R})$ values obtained by treatment of **2** with (*S*)- and (*R*)-MTPA chloride, respectively, were almost identical with those obtained for **1**, the absolute configurations were also assigned as the same 3*R*, 14*R* as **1** (Figure 3). Thus, the structure of petrocortyne B was defined as the 43,44-dihydro derivative of petrocortyne A.

Petrocortyne C (**3**) was isolated as a colorless gum. The molecular formula of this compound was established as $C_{46}H_{70}O_3$ by combined high-resolution mass and ^{13}C NMR analysis. Spectral data of **3** were highly compatible with those obtained for **1**. However, the ^{13}C NMR spectrum showed several significant differences. The most noticeable change was the replacement of signals of the diacetylenic carbinol group (C-12 ~ C-16) of **1** by those at δ 180.45 (C), 170.11 (C, two carbons), and 112.66 (CH, two carbons) in **3**. In addition, signals of the allylic methylenes at C-11 and C-17 were shifted downfield to δ 33.57 and 33.48, respectively. Corresponding differences were also observed in the 1H NMR spectrum in which signal of the H-14 proton at δ 5.09 (1H, br s) of **1** was replaced by downfield signals at δ 6.23 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) and 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz). These differences were accommodated by a γ -pyrone ring produced by an oxidative cyclization of the diacetylenic carbinol group of **1**. Supporting evidences for this interpretation were obtained by IR and UV spectra; ν max 1660 and 1600 cm^{-1} , λ max (log ϵ) 252 (4.04) nm.

Confirmation of the structure of **3** and NMR assignments of its key protons and carbons were established by a combination of the 1H COSY, TOCSY, HMQC, and HMBC experiments. Long-range H-C correlations of the protons at δ 6.23, 6.21, 2.53 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), and 2.52 (2H, t, $J = 7.6$ Hz) with downfield carbons were particularly helpful to confirm the presence of the γ -pyrone ring as well as its location. Thus, the structure of petrocortyne C was determined as a linear polyacetylene possessing a γ -pyrone ring. Compound **3** contained

an asymmetric carbon center at C-3. The structural similarity of this compound with 1 and 2 suggested a 3*R* configuration. However, this speculation was not confirmed by the Mosher's method since treatment of 3 with (*S*)- and (*R*)-MTPA chloride under various conditions resulted in rapid decomposition of the reactant.

Biogenetically the γ -pyrone ring of petrocortyne C (3) is considered most likely to be produced by an oxidative cyclization of the diacetylenic carbinol group of petrocortyne A (1) (scheme 1). Oxidation of the C-14 hydroxyl group would form an unsaturated ketone. As frequently observed in the lipid biosynthesis, lipoxygenase-induced oxidation of a triple bond would synthesize a hydroperoxide as an intermediate.^{23,24} Cleavage of the peroxide bond induced by an electron donor such as an elementary metal followed by cyclization involving another triple bond would form the γ -pyrone ring. It is not unusual that secondary metabolites are found together with their putative biosynthetic precursors. As a recent example, adociacetylene B contained a furan ring formed by an oxidative cyclization of an enediol group of petrosynol, a derivative isolated from the same specimen of the sponge *Adocia* sp.⁷ To the best of our knowledge, however, this is the first example of a compound possessing a γ -pyrone ring formed by an oxidative cyclization of a diacetylenic carbinol group.



Scheme 1. Proposed biosynthetic pathway of the γ -pyrone ring of petrocortyne C(3).

In addition to petrocortynes A-C, several linear polyacetylenes were also isolated from the same specimen. However, all of these compounds were composed of 30 carbons instead of 46 carbons of petrocortynes. Petrosiacetylene A (4) was isolated as a colorless oil. The high-resolution mass data defined the molecular formula as $C_{30}H_{40}O_2$ for this compound. However, the ^{13}C NMR spectrum of 4 showed only 15 carbon signals suggesting the presence of a molecular symmetry in this compound. Since all of the proton and carbon signals were well-resolved in the NMR spectra, the structure of 4 was readily determined as a symmetric linear tetraacetylene by combined 2-D NMR experiments.

Compound 4 possessed three double bonds and two asymmetric carbon centers. The geometry of double bonds at C-4 and C-26 was assigned as *E* for both by measurement of the proton-proton coupling constant ($J_{4,5} = J_{26,27} = 15.4$ Hz). However, that of the C-15 double bond located at the symmetric center of the molecule was not determined by coupling constant analysis. Although signal of the C-14 (C-17) allylic carbon was observed at very upfield (δ 17.15) in the ^{13}C NMR spectrum, shielding effect of the adjacent acetylenic group hindered us from defining the stereochemistry by chemical shift analysis. Consequently the

geometry of this double bond was assigned as *Z* from a comparison of the ^{13}C NMR data with those of **7**, a derivative possessing an asymmetric double bond at the same position, as discussed later.

As in the cases of **1-3**, the stereochemistry of the asymmetric carbon centers at C-3 and C-28 was approached by the modified Mosher's method. Surprisingly the (*S*)-MTPA ester (**4S**) gave an identical ^1H NMR spectrum with the (*R*)-MTPA ester (**4R**). Moreover, signals of the H-1 and H-30 acetylenic protons, identical in the ^1H NMR spectrum of **4**, were clearly resolved into two peaks of same area in **4S** and **4R**; δ 2.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz) and 2.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz). A combination of the ^1H COSY and TOCSY data for both compounds revealed that the configurations of asymmetric carbon centers were opposite to each other. The only possible explanation for this phenomenon was that **4** must be either a *meso*-compound (3*R*, 28*S*) or an 1:1 mixture of enantiomers (3*R*, 28*R* and 3*S*, 28*S*). To clarify this, several attempts to separate the MTPA esters by HPLC and GC resulted in the isolation of only one compound. In addition, similar attempts using the other semi-synthetic ester containing additional asymmetric carbon centers, bis-(*S*)-2-methylbutyl ester (**4X**) gave the same result. Thus, stereochemically petrosiacetylene A (**4**) was defined as a *meso*- compound possessing the 3*R*, 28*S* configurations.

A closely related metabolite, petrosiacetylene B (**5**) was isolated as an oil which analyzed for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_2$ by high-resolution mass and ^{13}C NMR spectrometry. Spectral data for this compound were reminiscent of those derived from **4**. However, signals of 30 carbons, instead of 15 signals of **4**, were observed in the ^{13}C NMR spectrum of **5** revealing that the molecular symmetry of **4** disappeared in this compound. Careful examination of the ^{13}C NMR spectrum showed that a triple bond located at the central part of **4** was replaced by a double bond in **5**. Corresponding differences were also observed in the ^1H NMR spectrum in which signals of a new double bond and a double-allylic methylene protons appeared at δ 5.38 (1H, m), 5.33 (1H, br dd, $J = 10.7$ and 6.8 Hz), and 2.79 (2H, dd, $J = 6.8$ and 5.9 Hz), respectively. Therefore, **5** was defined as the 12,13-dihydro derivative of **4** that was confirmed by combined 2-D NMR experiments.

In addition to the terminal *E* double bonds at C-4 and C-26 ($J_{4,5} = J_{26,27} = 15.1$ Hz), **5** possessed two double bonds at C-12 and C-15. The geometry of the C-12 double bond was assigned as *Z* by measurement of coupling constant between the olefinic protons ($J_{12,13} = 10.7$ Hz). The geometry of the C-15 double bond was assigned as *Z* from a comparison of the ^{13}C NMR data with those of **7**, as discussed later. Compound **5** contained asymmetric carbon centers at the same C-3 and C-28 as **4**. An application of the Mosher's method showed that the absolute configurations of these centers were different from each other (3*R*,28*S* or 3*S*,28*R*) as observed for **4**; acetylenic protons at δ 2.63 and 2.59 for both of (*S*)- and (*R*)-MTPA esters (**5S** and **5R**). All of the key protons of both esters were confidently assigned on the basis of ^1H COSY and TOCSY experiments. The TOCSY data in particular showed a correlation between H-21 and H-25 which was crucial to distinguish the protons adjacent to C-3 from those adjacent to C-28. Thus, the absolute configurations of asymmetric carbon centers of **5** were assigned as 3*R*,28*S*, identical with those of **4**.

Petrosiacetylene C (**6**), a colorless oil, had the composition $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_2$ by high-resolution mass and ^{13}C NMR spectroscopic methods. Spectral data of **6** were reminiscent of those derived from **4**. Examination of the ^{13}C NMR spectra revealed that signals of the C-3 double bond were replaced by those of upfield methylenes. Corresponding changes were observed in the ^1H NMR spectrum in that signals of H-3 and H-28, attached to the hydroxy-bearing carbons were clearly resolved; δ 4.84 (H-28) and 4.37 (H-3). Detailed 2-D NMR experiments defined the structure of petrosiacetylene C as the 3,4-dihydro derivative of petrosiacetylene A.

In an attempt to determine the absolute configurations of the asymmetric centers at C-3 and C-28, **6** was

also treated with (*S*)- and (*R*)-MTPA chloride. Surprisingly peak areas of the H-1 and H-30 acetylenic protons in the ^1H NMR spectrum of both of the MTPA-esters were significantly different from each other, suggesting that **6** was indeed a mixture of stereoisomers. Consequently both of the MTPA esters were separated by HPLC to yield two compounds each; **6aS** and **6bS** from the (*S*)-MTPA esters and **6aR** and **6bR** from the (*R*)-MTPA esters, respectively. From a combination of the ^1H COSY and TOCSY experiments for each compound, the absolute configurations of the major component, **6a** were assigned as *3S*, *28S* while those of the minor one, **6b** were assigned as *3S*, *28R*. Based on a comparison of the peak areas of H-30 in the ^1H NMR spectrum of the MTPA esters, the relative concentration of **6a** and **6b** was estimated as 3:2.

Another related metabolite, petrosiacetylene **D** (**7**) was isolated as a colorless oil and a molecular formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2$ was deduced by a combination of high-resolution mass and ^{13}C NMR spectroscopic data. The replacement of a triple bond located at the central part of **4** by a saturated one was readily recognized in the NMR data. By a comparison of spectral data and also by combined 2-D NMR experiments, the structure of **7** was defined as the 12,13-tetrahydro derivative of **4**.

In addition to the *E* double bonds at C-4 and C-26, **7** possessed a double bond at C-15. The geometry of this double bond was determined as *Z* from an analysis of proton-proton coupling constant ($J_{15,16} = 10.7$ Hz). As mentioned earlier, compounds **4-6** contained a double bond at the same position as **7**. Since the chemical shifts of the allylic C-14 carbons of these compounds were very similar to each other (δ 17.15, 17.25, 17.22, and 17.21 for **4-7**, respectively), the geometry of the C-15 double bond was assigned as *Z* for all of these compounds.²⁰

As observed for **6**, the MTPA esterification of **7** revealed that this was indeed a 4:1 mixture of two stereoisomers. Separation of the mixtures of MTPA esters by HPLC followed by ^1H COSY and TOCSY experiments of each product assigned the absolute configurations of the major component, **7a** as *3R*, *28S* and those of the minor one, **7b** as *3R*, *28R*.

Stereochemical studies of petrosiacetylenes **A-D** revealed several unusual features. Firstly, **6** and **7** existed as diastereomeric mixtures that were unveiled only by treatment with MTPA chlorides, compounds possessing asymmetric carbon centers. A literature survey revealed that enantiomeric polyacetylenes were isolated from specimens of a sponge collected from different locations.³ To the best of our knowledge, however, this is the first example of diastereomeric polyacetylenes isolated from the same specimen. Secondly, the absolute configurations of C-3 and C-28 of **4**, **5**, **6b**, and **7a** were opposite from each other; *3R*, *28S* or *3S*, *28R*. Although highly symmetric polyacetylenes possessing asymmetric carbon centers at the same positions have been previously reported, the stereochemistry of these centers has been always the same in a molecule; *3R*, *28R* or *3S*, *28S*.^{7,9,18} In addition, the stereochemistry of C-3 and C-28, common among all of the petrosiacetylenes was not identical to each other revealing that the absolute configuration of these asymmetric yneol-ene center was unpredictable.

Sponge-derived polyacetylenes and related compounds are widely recognized to exhibit various bioactivities. In our measurement, **4** and **6** displayed significant toxicity (LC_{50} 0.22 and 19.9 ppm for **4** and **6**, respectively) against brine shrimp larvae while other petrosiacetylenes were not toxic ($\text{LC}_{50} > 300$ ppm). In contrast to the potent toxicity of petroformynes, however, petrocortynes were not toxic against brine shrimp larvae.^{12,16} In an inhibitory assay against RNA-based reverse transcriptase, **4** and **6** totally cleaved the template 16S rRNA obtained from *Escherichia coli*, at the concentration of $10\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ while other compounds did not cleave it at all. On the other hand, all of the petrocortynes and petrosiacetylenes including **4** and **6** did

not cleave a super-coiled DNA (pUC 119) at the same concentration. Our results suggested that the brine-shrimp lethality of these compounds resulted from the RNA-cleaving activity. Previously several linear polyacetylenes were reported to exhibit exceptionally potent brine-shrimp lethality.^{1,12,16} Toxicity of those compounds might also be attributed to the RNA-cleaving activity. Interestingly 4 and 6 contain an allylic ene-diyne functionality located at the central part of the molecule as a common structural feature which also distinguishes these compounds from other petrosiacetylenes. Therefore, it would be quite appropriate to suppose that this functional group plays a very important role on the bioactivity. In addition to 4 and 6, 3 and 7 exhibited weak inhibition against reverse transcriptase at the concentration of 10 μ g/20 μ L.

In the measurement of other enzyme-inhibitory activities, 5 and 6 displayed moderate inhibition (49 and 36%, respectively) against PLA₂ at the concentration of 50 μ g/mL while other petrosiacetylenes were much less active (20 and 23% for 4 and 7, respectively). Among petrocortynes, the γ -pyrone-containing 3 was significantly more active (42%) than the others (31 and 17% for 1 and 2, respectively). Similarly 5, and 6 exhibited weak inhibition (22, 26, and 25%, respectively) against Na⁺/K⁺ ATPase at the concentration of 20 μ g/mL while other compounds were not active.

EXPERIMENTAL

General Experimental Procedures. NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions on a Varian Unity 500 spectrometer. Proton and carbon NMR spectra were measured at 500 and 125 MHz, respectively. All of the chemical shifts were recorded with respect to internal Me₄Si. UV spectra were obtained in methanol using a Milton-Roy spectrophotometer. IR spectra were recorded on a Matsun GALAXY spectrophotometer. Mass spectra were obtained by using a VG ZAB-2FHF and a Jeol JMS-HX 110 high-resolution mass spectrometer and provided by the Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside and Korea Basic Science Institute, Taejeon, Korea, respectively. The optical rotations were measured on a JASCO digital polarimeter using a 5 cm cell. GC analysis was performed on a Hewlett-Packard HP 5890 II gas chromatograph using an Ω -wax-320 capillary column. Temperatures of injector and detector were 300 °C. A temperature gradient system was used for oven in that initial temperature was maintained at 270 °C for 5 min and then raised to 300 °C in the rate of 10 °C/min. All solvents used were spectral grade or were distilled from glass prior to use.

Animal material. The specimens of *Petrosia* sp.(sample number 94K-13) were collected by hand using SCUBA at 20-30 m depth in October, 1994 along the offshore of Keomun Island, South Sea, Korea.¹⁵ The sponge is mushroom shaped with a short stalk and measures 7 x 6.3 x 2 cm. The surface of the animal is smooth and has many oscules 1-2 mm in diameter. The color is purple on the top, but beige underneath in life. Consistency of the specimen is very firm. This sponge has both thick and thin oxeas of various sizes; three categories of thick oxeas - 265-300 x 17-18, 100-160 x 11-12, and 60-90 x 12-15 μ m (strongylote); three categories of thin oxeas - 170-200 x 9-11, 120-160 x 4-5, and 45-55 x 2.5 μ m. Morphologically this sponge is very similar to *P. corticata*, but differs in possessing only oxeas and no large strongylotes.

Extraction and isolation. The freshly collected samples were immediately frozen and kept at -25 °C until chemically investigated. The sponge (5.5 kg, wet weight) was defrosted, macerated, and extracted with

MeOH (6 L x 2) and CH₂Cl₂ (6 L x 2). The combined extracts (353.41 g) were partitioned between CH₂Cl₂ and water. The CH₂Cl₂ layer (100.61 g) was dried under vacuum and re-partitioned between *n*-hexane (71.20 g) and 25 % aqueous MeOH (18.53 g).

An aliquot (10.80 g) of the hexane layer was separated by silica vacuum flash chromatography by using sequential mixtures of *n*-hexane and EtOAc as eluents. Fractions eluted with 25-35 % EtOAc/*n*-hexane were combined and separated by silica semi-prep HPLC (YMC silica column, 1 cm x 25 cm, 20% EtOAc/*n*-hexane). Final purification by reversed-phase HPLC (YMC C₁₈ column, 1 cm x 25 cm, MeOH) yielded 1 (70.0 mg) and 2 (25.7 mg). Fractions eluted with 40-45 % EtOAc/*n*-hexane were combined and separated by reversed-phase HPLC (YMC C₁₈-HP₈₀ column, 1 cm x 25 cm, 10% aqueous MeOH) to afford 3 (19.5 mg).

The aqueous MeOH layer was separated by C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography (YMC ODS-A gel) using gradient mixtures of MeOH and water as eluents. A fraction eluted with 10% aqueous MeOH was separated by C₁₈ reversed-phase HPLC (Shiseido Capcell pak column, 15% aqueous MeOH) to yield partially pure 4-7 in the order of 6, 7, 4, and 5. Final purification by HPLC under different solvent condition (30% aqueous MeCN) gave pure compounds; 9.5, 8.1, 11.7, and 8.2 mg for 4-7, respectively.

Petrocortyne A(1) - a colorless gum: $[\alpha]^{25}_D +6.4^\circ$ (*c* 0.25, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 223 (4.32) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400, 3310, 2925, 2850, 2250, 2100, 1460, 1300, 1115, 1005, 970 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.99 (1H, dt, 10.7, 7.3, H-43), 5.90 (1H, dt, 15.6, 7.0, H-5), 5.61 (1H, dddt, 15.6, 5.9, 1.5, 1.0, H-4), 5.43 (1H, ddt, 10.7, 2.4, 1.0, H-44), 5.36-5.32 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 5.09 (1H, br s, H-14), 4.83 (1H, br d, 5.9, H-3), 3.06 (1H, d, 2.4, H-46), 2.56 (1H, dd, 2.0, 1.0, H-1), 2.32 (2H, dt, 7.3, 7.3, H-42), 2.23 (2H, br t, 6.3, H-17), 2.22 (2H, br t, 6.3, H-11), 2.07 (2H, dt, 7.0, 6.7, H-6), 2.04 (2H, m, H-20), 2.03 (2H, m, H-23), 2.02 (4H, m, H-26, -29), 1.53 (2H, m, H-18), 1.50 (2H, m, H-10), 1.43 (2H, m, H-19), 1.39 (4H, m, H-7, -41), 1.37 (2H, m, H-9), 1.35 (4H, m, H-24, -25), 1.32 (4H, m, H-8, -30), 1.30-1.25 (20H, m, H-31 ~ -40); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 146.27 (CH, C-43), 134.29 (CH, C-5), 130.20 (CH, C-22/-27), 130.06 (CH, C-22/-27), 129.64 (CH, C-21/-28), 129.30 (CH, C-21/-28), 128.54 (CH, C-4), 107.88 (CH, C-44), 85.02 (C, C-12/-16), 84.96 (C, C-12/-16), 83.29 (C, C-2), 81.12 (CH, C-46), 80.58 (C, C-45), 78.14 (C, C-13/-15), 78.13 (C, C-13/-15), 73.99 (CH, C-1), 62.78 (CH, C-3), 52.56 (CH, C-14), 31.77 (CH₂, C-6), 30.28 (CH₂, C-42), 29.79 (CH₂, C-30), 29.70 (CH₂ x 2), 29.68 (CH₂ x 2), 29.67 (CH₂ x 2), 29.59 (CH₂), 29.45 (CH₂, C-39), 29.40 (CH₂, C-24), 29.35 (CH₂ x 2), 29.19 (CH₂, C-40), 28.90 (CH₂, C-19), 28.74 (CH₂), 28.58 (CH₂, C-9), 28.56 (CH₂, C-7), 28.51 (CH₂), 28.22 (CH₂, C-10), 27.95 (CH₂, C-18), 27.25 (CH₂, C-26/-29), 27.15 (CH₂, C-26/-29), 27.11 (CH₂, C-23), 26.68 (CH₂, C-20), 18.67 (CH₂, C-11/-17), 18.65 (CH₂, C-11/-17); HRDCIMS [M+NH₄]⁺ *m/z* 672.5707; calculated C₄₆H₇₄NO₂, 672.5720; LREIMS *m/z* (relative intensity) 503 (5), 464 (9), 439 (46), 435 (15), 407 (11), 355 (42), 341 (31), 325 (17), 299 (14), 273 (19), 171 (50), 145 (63), 111 (100).

Petrocortyne B(2) - a colorless gum: $[\alpha]^{25}_D +3.4^\circ$ (*c* 0.26, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3400, 3300, 2920, 2850, 2250, 2100, 1630, 1460, 1245, 1005, 970 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.90 (1H, dt, 15.6, 6.9, H-5), 5.61 (1H, br ddt, 15.6, 6.4, 2.0, H-4), 5.36-5.33 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 5.09 (1H, dd, 2.0, 2.0, H-14), 4.84 (1H, br d, 6.4, H-3), 2.56 (1H, br d, 2.0, H-1), 2.23 (2H, td, 6.8, 2.0, H-17), 2.22 (2H, td, 6.8, 2.0, H-11), 2.17 (2H, br t, 7.3, H-44), 2.17 (1H, br s, H-46), 2.07 (1H, dt, 6.9, 6.9, H-6), 2.04 (2H, m, H-20), 2.03 (2H, m, H-23), 2.02 (4H, m, H-26, -29), 1.53 (2H, m, H-18), 1.51 (4H, m, H-10, -43), 1.43 (2H, m, H-19), 1.39 (2H, m, H-7), 1.37 (4H, m, H-9, -42), 1.35 (4H, m, H-24, -25), 1.32 (4H, m, H-8, -30), 1.30-1.25 (22H, m, H-31 ~ -41); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 134.27 (CH, C-5), 130.20 (CH, C-22/-27),

130.05 (CH, C-22/-27), 129.63 (CH, C-21/-28), 129.29 (CH, C-21/-28), 128.53 (CH, C-4), 84.98 (C, C-12/-16), 84.92 (C, C-12/-16), 84.81 (C, C-45), 83.28 (C, C-2), 78.12 (C, C-13/-15), 78.11 (C, C-13/-15), 73.97 (CH, C-1), 68.01 (CH, C-46), 62.74 (CH, C-3), 52.50 (CH, C-14), 31.74 (CH₂, C-6), 29.75 (CH₂, C-30), 29.67 (CH₂ x 4), 29.64 (CH₂ x 2), 29.59 (CH₂), 29.56 (CH₂), 29.49 (CH₂), 29.36 (CH₂), 29.31 (CH₂ x 2), 29.09 (CH₂), 28.86 (CH₂, C-19), 28.75 (CH₂, C-42), 28.55 (CH₂, C-7), 28.52 (CH₂, C-9), 28.48 (CH₂ x 2, C-8, -43), 28.18 (CH₂, C-10), 27.91 (CH₂, C-18), 27.22 (CH₂, C-26/-29), 27.12 (CH₂, C-26/-29), 27.08 (CH₂, C-23), 26.64 (CH₂, C-20), 18.63 (CH₂, C-11/-17), 18.62 (CH₂, C-11/-17), 18.38 (CH₂, C-44); HRDCIMS [M+NH₄]⁺ *m/z* 674.5796; calculated C₄₆H₇₆NO₂, 674.5877; LREIMS *m/z* (relative intensity) 466 (5), 437 (4), 369 (5), 357 (8), 343 (7), 327 (4), 301 (14), 189 (44), 175 (45), 145 (49), 133 (66), 67 (100).

Petrocortyne C(3) - a colorless gum: [α]_D²⁵ +6.2° (c 0.25, MeOH); UV (MeOH) λ max (log ϵ) 252 (4.04), 223 (4.31) nm; IR (KBr) ν max 3400, 3310, 2925, 2850, 1735, 1660, 1600, 1465, 1150, 1025 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.23 (1H, d, 2.0, H-15), 6.21 (1H, d, 2.0, H-13), 5.99 (1H, dt, 10.8, 7.3, H-43), 5.88 (1H, dt, 15.1, 7.1, H-5), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.4, 1.5, H-4), 5.43 (1H, ddt, 10.8, 2.4, 1.0, H-44), 5.39 (1H, m, H-22), 5.36 (1H, m, H-27), 5.34 (1H, m, H-28), 5.33 (1H, m, H-21), 4.84 (1H, br d, 5.9, H-3), 3.06 (1H, d, 2.4, H-46), 2.56 (1H, br d, 2.0, H-1), 2.53 (2H, t, 7.6, H-17), 2.52 (2H, t, 7.6, H-11), 2.32 (2H, br dt, 7.3, 7.3, H-42), 2.07 (4H, dt, 7.3, 7.3, H-6, -20), 2.04 (2H, m, H-23), 2.02 (4H, m, H-26, -29), 1.66 (2H, m, H-18), 1.64 (2H, m, H-10), 1.41 (4H, m, H-7, -19), 1.39 (2H, m, H-41), 1.37 (2H, m, H-24), 1.35 (4H, m, H-9, -25), 1.32 (4H, m, H-8, -30), 1.30-1.26 (20H, m, H-31 ~ -40); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 180.45 (C, C-14), 170.11 (C x 2, C-12, -16), 146.25 (CH, C-43), 133.85 (CH, C-5), 130.60 (CH, C-22), 130.08 (CH, C-27), 129.54 (CH, C-28), 128.83 (CH, C-4), 128.73 (CH, C-21), 112.66 (CH x 2, C-13, -15), 107.88 (CH, C-44), 83.37 (C, C-2), 81.12 (CH, C-46), 80.58 (C, C-45), 73.91 (CH, C-1), 62.67 (CH, C-3), 33.57 (CH₂, C-11/-17), 33.48 (CH₂, C-11/-17), 31.66 (CH₂, C-6), 30.30 (CH₂, C-42), 29.80 (CH₂), 29.71 (CH₂), 29.70 (CH₂ x 2), 29.69 (CH₂ x 2), 29.61 (CH₂ x 2), 29.47 (CH₂), 29.42 (CH₂, C-24/-25), 29.37 (CH₂), 29.34 (CH₂, C-24/-25), 29.21 (CH₂, C-40), 28.95 (CH₂, C-19), 28.76 (CH₂, C-41), 28.53 (CH₂, C-7), 28.53 (CH₂, C-9), 28.50 (CH₂, C-8), 27.28 (CH₂, C-26), 27.21 (CH₂, C-29), 27.12 (CH₂, C-23), 26.75 (CH₂, C-20), 26.59 (CH₂, C-10), 26.36 (CH₂, C-18); HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 693.5249; calculated C₄₆H₇₀O₃Na, 693.5223; LREIMS *m/z* (relative intensity) 469 (1), 430 (7), 353 (11), 257 (7), 236 (5), 213 (4), 195 (29), 173 (71), 143 (65), 73 (100).

Petrosiacetylene A(4) - a colorless oil: [α]_D²⁵ 0° (c 0.63, MeOH); IR (KBr) ν max 3400, 3310, 2930, 2860, 2100, 1650, 1460, 1285, 1090, 1015, 970 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.91 (2H, ddt, 15.4, 1.0, 7.1, H-5, -26), 5.61 (2H, ddt, 15.4, 5.9, 1.5, H-4, -27), 5.48 (2H, t, 4.6, H-15, -16), 4.83 (2H, ddd, 5.9, 2.5, 1.0, H-3, -28), 2.92 (4H, dt, 4.9, 2.3, H-14, -17), 2.56 (2H, d, 2.5, H-1, -30), 2.13 (4H, tt, 7.1, 2.3, H-11, -20), 2.07 (4H, td, 7.3, 7.1, H-6, -25), 1.47 (4H, m, H-10, -21), 1.41 (4H, m, H-7, -24), 1.38 (4H, m, H-9, -22), 1.31 (4H, m, H-8, -23); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 134.37 (CH, C-5, -26), 128.45 (CH, C-4, -27), 126.46 (CH, C-15, -16), 83.32 (C, C-2, -29), 80.39 (C, C-12, -19), 77.67 (C, C-13, -18), 73.95 (CH, C-1, -30), 62.73 (CH, C-3, -28), 31.82 (CH₂, C-6, -25), 28.82 (CH₂, C-10, -21), 28.64 (CH₂, C-7, -24), 28.61 (CH₂, C-8, -23), 28.59 (CH₂, C-9, -22), 18.69 (CH₂, C-11, -20), 17.15 (CH₂, C-14, -17); HRFABMS [M+Na]⁺ *m/z* 455.2949; calculated C₃₀H₄₀O₂Na, 455.2926.

Petrosiacetylene B(5) - a colorless oil: [α]_D²⁵ -0.3° (c 0.49, MeOH); IR (KBr) ν max 3400, 3300, 2930, 2860, 2095, 1650, 1465, 1230, 1085, 970 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.91 (2H, br dt, 15.1, 6.9, H-5,

-26), 5.61 (2H, br dd, 15.1, 5.9, H-4, -27), 5.44 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.38 (1H, m, H-12), 5.33 (1H, br dd, 10.7, 6.8, H-13), 4.83 (2H, br d, 5.9, H-3, -28), 2.93 (2H, br d, 5.4, H-17), 2.79 (2H, dd, 6.8, 5.9, H-14), 2.56 (2H, d, 2.0, H-1, -30), 2.14 (2H, tt, 7.1, 2.1, H-20), 2.08 (4H, td, 7.3, 6.9, H-6, -25), 2.04 (2H, td, 6.9, 6.5, H-11), 1.47 (2H, m, H-21), 1.40 (4H, m, H-7, -24), 1.38 (2H, m, H-22), 1.35 (2H, m, H-10), 1.31-1.28 (6H, m, H-8, -9, -23); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 134.46 (CH, C-5/-26), 134.40 (C-5/-26), 130.56 (CH, C-12), 129.40 (CH, C-15), 128.40 (CH, C-4/-27), 128.36 (CH, C-4/-27), 127.13 (CH, C-13), 125.22 (CH, C-16), 83.32 (C, C-2/-29), 83.31 (C, C-2/-29), 80.14 (C, C-19), 78.21 (C, C-18), 73.98 (CH, C-1/-30), 73.97 (CH, C-1/-30), 62.80 (CH, C-3/-28), 62.79 (CH, C-3/-28), 31.93 (CH_2 , C-6/-25), 31.88 (CH_2 , C-6/-25), 29.53 (CH_2 , C-10), 29.10 (CH_2 , C-8/-9), 29.06 (CH_2 , C-8/-9), 28.93 (CH_2 , C-21), 28.80 (CH_2 , C-7/-24), 28.71 (CH_2 , C-7/-24), 28.68 (CH_2 , C-23), 28.66 (CH_2 , C-22), 27.22 (CH_2 , C-11), 25.55 (CH_2 , C-14), 18.79 (CH_2 , C-20), 17.25 (CH_2 , C-17); HRFABMS $[\text{M}+\text{K}]^+ m/z$ 473.2777; calculated $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{K}$, 473.2823.

Petrosiacetylene C(6) - a colorless oil: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -0.2^\circ$ (c 0.15, MeOH); IR (KBr) ν max 3400, 3295, 2930, 2855, 2100, 1660, 1465, 1240, 1060, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.91 (1H, br dt, 15.6, 6.6, H-26), 5.61 (1H, br dd, 15.6, 6.2, H-27), 5.49 (2H, t, 4.6, H-15, -16), 4.84 (1H, br d, 6.2, H-28), 4.37 (1H, td, 6.6, 2.0, H-3), 2.93 (4H, dt, 4.6, 2.0, H-14, -17), 2.56 (1H, d, 2.0, H-30), 2.46 (1H, d, 2.0, H-1), 2.14 (4H, tt, 6.8, 2.0, H-11, -20), 2.09 (2H, dt, 6.6, 6.6, H-25), 1.71 (2H, m, H-4), 1.46 (4H, m, H-10, -21), 1.44 (2H, m, H-5), 1.40 (2H, m, H-24), 1.38 (2H, m, H-22), 1.34 (2H, m, H-9), 1.31-1.28 (8H, m, H-6, -7, -8, -23); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 134.41 (CH, C-26), 128.40 (CH, C-27), 126.47 (CH, C-15/-16), 126.43 (CH, C-15/-16), 84.98 (C, C-2), 83.58 (C, C-29), 80.48 (C x 2, C-12, -19), 77.68 (C x 2, C-13, -18), 73.98 (CH, C-30), 72.85 (CH, C-1), 62.79 (CH, C-28), 62.33 (CH, C-3), 37.65 (CH_2 , C-4), 31.88 (CH_2 , C-25), 29.39 (CH_2), 29.19 (CH_2), 29.05 (CH_2), 28.98 (CH_2 , C-10/-21), 28.89 (CH_2 , C-10/-21), 28.84 (CH_2 , C-9), 28.70 (CH_2 , C-24), 28.67 (CH_2 , C-23), 28.65 (CH_2 , C-22), 25.01 (CH_2 , C-5), 18.79 (CH_2 , C-11/-20), 18.76 (CH_2 , C-11/-20), 17.22 (CH_2 x 2, C-14, -17); HRDCIMS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ m/z$ 452.3529; calculated $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{NO}_2$, 452.3529.

Petrosiacetylene D(7) - a colorless oil: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +5.2^\circ$ (c 0.27, MeOH); IR (KBr) ν max 3400, 3295, 2930, 2850, 2095, 1650, 1460, 1290, 1090, 1010, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 5.91 (2H, dt, 15.4, 6.7, H-5, -26), 5.61 (2H, dd, 15.4, 6.1, H-4, -27), 5.44 (1H, dt, 10.7, 6.4, H-15), 5.41 (1H, dt, 10.7, 5.9, H-16), 4.83 (2H, br d, 6.1, H-3, -28), 2.89 (2H, dt, 5.9, 2.4, H-17), 2.56 (2H, d, 2.0, H-1, -30), 2.14 (2H, tt, 7.1, 2.4, H-20), 2.08 (4H, td, 7.1, 6.7, H-6, -25), 2.03 (2H, td, 7.3, 6.4, H-14), 1.47 (2H, m, H-21), 1.40 (2H, m, H-24), 1.38 (4H, m, H-7, -22), 1.34 (2H, m, H-13), 1.31 (2H, m, H-23), 1.29-1.26 (10H, m, H-8 ~ -12); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 134.56 (CH, C-5/-26), 134.41 (CH, C-5/-26), 131.30 (CH, C-15), 128.39 (CH, C-4/-27), 128.30 (CH, C-4/-27), 124.92 (CH, C-16), 83.33 (C, C-2/-29), 83.31 (C, C-2/-29), 79.94 (C, C-19), 78.52 (C, C-18), 73.98 (CH, C-1/-30), 73.96 (C-1/-30), 62.81 (CH, C-3/-28), 62.79 (CH, C-3/-28), 31.95 (CH_2 , C-6/-25), 31.88 (CH_2 , C-6/-25), 29.54 (CH_2), 29.50 (CH_2), 29.46 (CH_2), 29.41 (CH_2 , C-13), 29.27 (CH_2), 29.19 (CH_2), 28.95 (CH_2 , C-21), 28.84 (CH_2 , C-7), 28.71 (CH_2 , C-24), 28.69 (CH_2 , C-23), 28.65 (CH_2 , C-22), 27.13 (CH_2 , C-14), 18.79 (CH_2 , C-20), 17.21 (CH_2 , C-17); HRFABMS $[\text{M}+\text{K}]^+ m/z$ 475.2927; calculated $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_2\text{K}$, 475.2978.

Ozonolysis of petrocortyne A. To a stirred solution of 4.5 mg of 1 in 0.3 mL of dry pyridine was added 0.2 mL of acetic anhydride. After stirring the mixture at room temperature overnight, the solvent and excess anhydride were removed under vacuum. The residue was redissolved in 2 mL of dry CHCl_3 and cooled

to -42 °C. Ozone was bubbled into the solution for 5 min and the mixture was further stirred at room temperature for 15 min. After removing the solvent by blowing with N₂, 1 mL of conc. acetic acid and 0.3 mL of H₂O₂ (35%) were added to the residue and stirred at 50 °C for 13 hr. After drying the mixture under vacuum, 1 mL of 5% methanolic HCl was added. After stirring the mixture at room temperature overnight, the solvent was removed under vacuum and the residue was extracted with *n*-hexane. GC analysis of the extract gave peaks at 2.760 (area 0.58), 3.670 (0.36), and 16.230 (0.39) min retention, respectively. The peaks were determined as methyl esters of adipic, suberic, and hexadecanedioic acids by co-injections with authentic compounds (Sigma).

Preparation of MTPA esters of polyacetylenes. MTPA esters were prepared following the methods described previously.²⁵ To a solution of a polyacetylene in 0.5 mL of dry pyridine was added 20 μl of (*S*)- or (*R*)-MTPA chloride. The mixture was allowed to stand under N₂ at room temperature for 3 hrs. After confirming the consumption of starting material by TLC, 0.5 mL of H₂O, 0.3 mL of CH₂Cl₂, and 1 mL of MeOH were added. After removing the solvents under vacuum, the residue was redissolved in 2 mL of 5% EtOAc/*n*-hexane and filtered through silica column. For 4-7, the residue was further separated by reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 5% aqueous MeCN) to afford pure MTPA esters.

(*S*)-MTPA ester of 1. From 4.9 mg of **1** was obtained 3.2 mg of **1S**; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.21 (1H, dd, 2.0, 2.0, H-14), 6.06 (1H, dt, 15.6, 6.8, H-5), 6.01 (1H, br dd, 6.8, 2.0, H-3), 6.00 (1H, br dt, 10.7, 7.3, H-43), 5.60 (1H, br dd, 15.6, 6.8, H-4), 5.44 (1H, ddt, 10.7, 2.0, 1.5, H-44), 5.39-5.29 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 3.07 (1H, d, 2.0, H-46), 2.59 (1H, d, 2.0, H-1), 2.33 (2H, dt, 7.3, 7.3, H-42), 2.22 (2H, td, 7.3, 2.0, H-11), 2.21 (2H, td, 7.3, 2.0, H-17), 2.08 (2H, td, 7.3, 6.8, H-6), 2.03-2.00 (8H, m, H-20, -23, -26, -29); HRFABMS [M+Na]⁺ 887.3760; calculated C₅₀H₅₄F₆O₆Na, 887.3723.

(*R*)-MTPA ester of 1. From 5.1 mg of **1** was obtained 3.9 mg of **1R**; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.22 (1H, dd, 2.0, 2.0, H-14), 6.03 (1H, ddd, 6.8, 2.4, 1.0, H-3), 6.00 (1H, dt, 15.1, 6.8, H-5), 6.00 (1H, br dt, 10.7, 7.3, H-43), 5.50 (1H, br dd, 15.1, 6.8, H-4), 5.44 (1H, ddt, 10.7, 2.4, 1.0, H-44), 5.39-5.30 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 3.59 (6H, s, OMe), 3.07 (1H, d, 2.4, H-46), 2.63 (1H, d, 2.4, H-1), 2.33 (2H, dt, 7.3, 7.3, H-42), 2.23 (2H, td, 7.3, 2.0, H-17), 2.19 (2H, td, 7.3, 2.0, H-11), 2.04 (2H, td, 7.3, 6.8, H-6), 2.03-1.99 (8H, m, H-20, -23, -26, -29); HRFABMS [M+Na]⁺ 887.3735; calculated C₅₀H₅₄F₆O₆Na, 887.3723.

(*S*)-MTPA ester of 2. From 4.1 mg of **2** was prepared 4.0 mg of **2S**; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.22 (1H, dd, 2.0, 2.0, H-14), 6.06 (1H, ddt, 15.6, 1.0, 6.8, H-5), 6.01 (br dd, 6.8, 2.0, H-3), 5.60 (1H, ddt, 15.6, 6.8, 1.5, H-4), 5.39-5.28 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.59 (1H, d, 2.0, H-1), 2.22 (2H, td, 7.3, 2.0, H-11), 2.21 (2H, td, 7.3, 2.0, H-17), 2.19 (1H, br s, H-46), 2.18 (2H, br t, 7.3, H-44), 2.08 (2H, td, 7.3, 6.8, H-6), 2.04-1.99 (8H, m, H-20, -23, -26, -29).

(*R*)-MTPA ester of 2. From 4.6 mg of **2** was prepared 3.7 mg of **2R**; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.22 (1H, br d, 1.5, H-14), 6.04 (1H, br d, 6.8, H-3), 6.00 (1H, br dt, 15.1, 6.8, H-5), 5.50 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.0, H-4), 5.39-5.29 (4H, m, H-21, -22, -27, -28), 3.59 (6H, s, OMe), 2.63 (1H, d, 1.5, H-1), 2.23 (2H, td, 7.3, 1.5, H-17), 2.19 (2H, td, 7.3, 2.0, H-11), 2.19 (br s, H-46), 2.18 (2H, br t, 7.3, H-44), 2.05 (2H, td, 7.3, 6.8, H-6), 2.04-2.00 (8H, m, H-20, -23, -26, -29).

(S)-MTPA ester of 4. From 3.1 mg of 4 was obtained 2.0 mg of 4S; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 7.1, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-26), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4), 5.50 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-27), 5.48 (2H, br t, 4.9, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, 4.9, 2.4, H-14, -17), 2.63 (1H, d, 2.4, H-30), 2.59 (1H, d, 2.4, H-1), 2.12 (4H, br t, 7.1, H-11, -20), 2.08 (2H, dt, 7.1, 7.1, H-6), 2.05 (2H, dt, 7.1, 7.1, H-25), 1.45 (4H, m, H-10, -21), 1.38 (2H, m, H-7), 1.36 (4H, m, H-9, -22), 1.35 (2H, m, H-24), 1.28 (2H, m, H-8), 1.26 (2H, m, H-23).

(R)-MTPA ester of 4. From 3.0 mg of 4 was obtained 2.1 mg of 4R; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 7.1, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-5), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-27), 5.50 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4), 5.48 (2H, br t, 4.9, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, 4.9, 2.4, H-14, -17), 2.63 (1H, d, 2.4, H-1), 2.59 (1H, d, 2.4, H-30), 2.12 (4H, br t, 7.1, H-11, -20), 2.08 (2H, dt, 7.1, 7.1, H-25), 2.05 (2H, dt, 7.1, 7.1, H-6), 1.45 (4H, m, H-10, -21), 1.38 (2H, m, H-24), 1.36 (4H, m, H-9, -22), 1.35 (2H, m, H-7), 1.28 (2H, m, H-23), 1.26 (2H, m, H-8).

(S)-MTPA ester of 5. From 2.6 mg of 5 was obtained 1.7 mg of 5S; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.4, ArH), 7.41-7.37 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.00 (1H, br dt, 15.1, 6.8, H-26), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4), 5.50 (1H, ddt, 15.6, 6.8, 1.5, H-27), 5.43 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.36 (1H, m, H-12), 5.34 (1H, m, H-13), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (2H, dt, 5.0, 2.4, H-17), 2.78 (2H, br dd, 6.8, 5.9, H-14), 2.63 (1H, d, 2.4, H-30), 2.59 (1H, d, 2.4, H-1), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.09 (2H, dt, 6.8, 6.8, H-6), 2.04 (4H, m, H-11, -25), 1.46 (2H, p, 7.3, H-21).

(R)-MTPA ester of 5. From 2.9 mg of 5 was obtained 2.1 mg of 5R; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.41-7.37 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.00 (1H, m, H-5), 5.61 (1H, br dd, 15.6, 6.8, H-27), 5.50 (1H, br dd, 15.1, 6.8, H-4), 5.43 (1H, m, H-16), 5.41 (1H, m, H-15), 5.37 (1H, m, H-12), 5.34 (1H, m, H-13), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (2H, dt, 4.9, 2.4, H-17), 2.79 (2H, br dd, 6.4, 6.4, H-14), 2.63 (1H, d, 2.0, H-1), 2.59 (1H, d, 2.0, H-30), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.09 (2H, dt, 6.8, 6.8, H-25), 2.04 (4H, m, H-6, -11), 1.46 (2H, p, 7.3, H-21).

(S)-MTPA esters of 6. From 3.1 mg of 6 were obtained 1.7 mg of 6aS and 1.1 mg of 6bS: 6aS; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.03 (1H, br d, 6.8, H-28), 6.01 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-26), 5.54 (1H, td, 6.8, 2.0, H-3), 5.50 (1H, br dd, 15.1, 6.8, H-27), 5.48 (2H, m, H-15, -16), 3.60 (3H, s, OMe), 3.56 (3H, s, OMe), 2.93 (4H, dt, 4.9, 2.4, H-14, -17), 2.63 (1H, d, 2.0, H-30), 2.54 (1H, d, 2.0, H-1), 2.13 (4H, m, H-11, -20), 2.05 (2H, dt, 6.8, 6.8, H-25), 1.79 (2H, m, H-4), 1.45 (4H, p, 7.3, H-10, -21); 6bS; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-26), 6.01 (1H, br d, 6.8, H-28), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-27), 5.54 (1H, dt, 6.8, 2.0, H-3), 5.48 (2H, m, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.93 (4H, dt, 4.9, 2.4, H-14, -17), 2.59 (1H, d, 2.4, H-30), 2.54 (1H, d, 2.0, H-1), 2.13 (4H, m, H-11, -20), 2.09 (2H, dt, 6.8, 6.8, H-25), 1.79 (2H, m, H-4), 1.45 (4H, p, 7.3, H-10, -21).

(R)-MTPA esters of 6. From 3.9 mg of 6 were obtained 1.7 mg of 6aR and 1.0 mg of 6bR: 6aR; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.43-7.39 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, br dt, 15.1, 6.8, H-26), 6.01 (1H, br d, 6.3, H-28), 5.61 (1H, br dd, 15.1, 7.2, H-27), 5.52 (1H, br t, 6.6, H-3), 5.48 (2H, t, 4.6,

H-15, -16), 3.55 (6H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, 4.6, 2.1, H-14, -17), 2.59 (1H, d, 2.4, H-30), 2.49 (1H, d, 2.4, H-1), 2.13 (4H, tt, 7.3, 2.0, H-11, -20), 2.09 (2H, td, 7.3, 6.8, H-25), 1.86 (2H, m, H-4), 1.46 (2H, m, H-21): **6bR**; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.42-7.38 (6H, m, ArH), 6.03 (1H, br d, 6.3, H-28), 6.00 (1H, br dt, 15.1, 7.1, H-26), 5.51 (1H, br t, 6.8, H-3), 5.50 (1H, m, H-27), 5.48 (2H, t, 4.6, H-15, -16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.92 (4H, dt, 4.6, 2.1, H-14, -17), 2.63 (1H, d, 2.4, H-30), 2.49 (1H, d, 2.0, H-1), 2.13 (4H, tt, 7.3, 2.1, H-11, -20), 2.05 (2H, td, 7.3, 6.8, H-25), 1.86 (2H, m, H-4), 1.45 (2H, m, H-21).

(*S*)-MTPA esters of **7**. From 2.5 mg of **7** were obtained 1.4 mg of **7aS** and 0.4 mg of **7bS**: **7aS**; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-5), 6.03 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, br dd, 15.1, 6.8, H-26), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4), 5.50 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, 4.9, 2.4, H-17), 2.63 (1H, d, 2.0, H-30), 2.59 (1H, d, 2.4, H-1), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.08 (2H, td, 7.3, 6.8, H-6), 2.06 (2H, m, H-25), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, 7.3, H-21): **7bS**; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (2H, ddt, 15.1, 1.0, 6.8, H-5, -26), 6.01 (2H, m, H-3, -28), 5.61 (2H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4, -27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.55 (6H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, 4.9, 2.4, H-17), 2.59 (2H, d, 2.4, H-1, -30), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.08 (4H, m, H-6, -25), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, 7.3, H-21).

(*R*)-MTPA esters of **7**. From 3.2 mg of **7** were obtained 1.6 mg of **7aR** and 0.5 mg of **7bR**: **7aR**; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.07 (1H, br dt, 15.1, 6.8, H-26), 6.03 (1H, m, H-3), 6.01 (1H, m, H-28), 6.01 (1H, br dd, 15.1, 6.8, H-5), 5.61 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-27), 5.50 (1H, ddt, 15.1, 6.8, 1.5, H-4), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (3H, s, OMe), 3.55 (3H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, 5.4, 2.4, H-17), 2.63 (1H, d, 2.4, H-1), 2.59 (1H, d, 2.4, H-30), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.09 (2H, dt, 7.3, 7.3, H-25), 2.04 (2H, m, H-6), 2.02 (2H, m, H-14), 1.46 (2H, p, 7.3, H-21): **7bR**; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.53 (4H, br d, 7.3, ArH), 7.41-7.38 (6H, m, ArH), 6.03 (2H, br d, 6.3, H-3, -28), 6.01 (2H, m, H-5, -26), 5.50 (2H, br dd, 15.1, 6.8, H-4, -27), 5.43 (1H, m, H-15), 5.41 (1H, m, H-16), 3.59 (6H, s, OMe), 2.90 (2H, dt, 5.4, 2.4, H-17), 2.63 (2H, d, 2.4, H-1, -30), 2.13 (2H, tt, 7.3, 2.4, H-20), 2.06-2.01 (6H, m, H-6, -14, -25), 1.45 (2H, p, 7.3, H-21).

(*S*)-2-methylbutyl ester of **4**. To a stirred solution of 0.9 mg of **4** in 3 mL of dry CH_2Cl_2 were added 1 mL of (*S*)-2-methylbutyric acid, 28 mg of DCC, and 1 mg of DMAP. The mixture was stirred under N_2 at room temperature for 2 hr. After removing the solvent by blowing with N_2 , the residue was separated by silica gel column chromatography (0.5 cm x 10 cm) by using 10 mL of 30% EtOAc/hexane as an eluent. Final purification was established by semi-prep reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 1 cm x 25 cm, 5% aqueous MeCN) to afford 0.9 mg of **4X** as a colorless oil: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.00 (2H, br dt, 15.1, 6.8, H-5, -26), 5.86 (1H, br d, 6.4, H-3/-28), 5.84 (1H, br d, 6.4, H-3/-28), 5.537 (1H, br dd, 15.1, 6.4, H-4/-27), 5.535 (1H, br dd, 15.1, 6.4, H-4/-27), 5.49 (2H, t, 4.4, H-15, -16), 2.93 (4H, dt, 4.4, 2.4, H-14, -17), 2.543 (1H, d, 2.0, H-1/-30), 2.538 (1H, d, 2.0, H-1/-30), 2.40 (2H, hex, 6.8, H-2', -2"), 2.13 (4H, tt, 7.3, 2.4, H-11, -20), 2.07 (4H, td, 7.3, 6.8, H-6, -25), 1.71 (1H, hex, 7.3, H-3'/-3"), 1.68 (1H, hex, 7.3, H-3'/-3"), 1.50 (2H, m, H-3', -3"), 1.47 (4H, p, 7.3, H-10, -21), 1.40 (4H, p, 7.3, H-7, -24), 1.35 (4H, m, H-9, -22), 1.30 (4H, m, H-8, -23), 1.16 (3H, d, 6.8, H-5'/-5"), 1.15 (3H, d, 7.3, H-5'/-5"), 0.92 (3H, t, 7.3, H-4'/-4"), 0.91 (3H, t, 7.3, H-4'/-4"); HRFABMS [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z 623.4092; calculated $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4\text{Na}$, 623.4076.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Hosung Chung, Polar Research Center, KORDI for assistance of collecting sponge samples. High-resolution mass spectral data were kindly provided by Drs. Richard Kondrat and Ron New, Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside, and Dr. Young Hwan Kim, Korea Basic Science Institute, Taejeon, Korea. Special thanks go to Ms. Young Hee Choi and Mr. Dong Ik Yi for assistance of laboratory work. This research was financially supported by Korea Ministry of Science and Technology Grant BSPN-00317 and -00332, and BSPE-00601.

REFERENCES AND NOTES

1. Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 259-302 and references cited therein.
2. Fusetani, N.; Shiragaki, T.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4313-4314.
3. Ortega, M. J.; Zubia, E.; Carballo, J. L.; Salva, J. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1069-1071.
4. Hallock, Y. F.; Cardellina II, J. H.; Balaschak, M. S.; Alexander, M. R.; Prather, T. R.; Shomaker, R. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1995**, *55*, 1801-1807.
5. Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina II, J. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 88-89.
6. Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina II, J. H.; Gray, G. N.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 860-865.
7. Kobayashi, M.; Mahmud, T.; Tajima, H.; Wang, W.; Aoki, S.; Nakagawa, S.; Mayumi, T.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 720-724.
8. Issacs, S.; Kashman, Y.; Loya, S.; Hizi, A.; Loya, Y. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10435-10438.
9. Fusetani, N.; Sugano, M.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4311-4312.
10. Fu, X.; Abbas, S. A.; Schmitz, F. J.; Vidavsky, I.; Gross, M. L.; Laney, M.; Schatzman, R. C.; Cabuslay, R. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 799-814.
11. Guo, Y.; Cavagnin, M.; Trivellone, E.; Cimino, G. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13261-13268.
12. Cimino, G.; De Giulio, S.; De Rosa, S.; Di Marzo, V. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 345-353.
13. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 126-130.
14. Uno, M.; Ohta, S.; Ohta, E.; Ikegami, S. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1146-1148.
15. The voucher specimens (Registry No. Por. 27) are deposited on the sponge collection, Natural History Museum, Han Nam University, under the curatorship of C. J. S.
16. Cimino, G.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; Di Marzo, V. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3563-3566.
17. Guo, Y.; Gavagnin, M.; Trivellone, E.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 712-722.
18. Ochi, M.; Arika, S.; Tatsukawa, A.; Kotsuki, H.; Fukuyama, Y.; Shibata, K. *Chem. Lett.* **1994**, 89-92.
19. Chamberlain, N. F. *The Practice of NMR Spectroscopy*; Plenum Press, New York and London, **1974**, p 75-91.
20. Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Pansini, M. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1275-1280.
21. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
22. Bernart, M. W.; Hallock, Y. F.; Cardellina II, J. H.; Boyd, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 993-994.
23. Aikens, J.; Dix, T. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15091-15098.
24. Nagle, D. G.; Gerwick, W. H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7227-7237.
25. Shin, J.; Seo, Y.; Rho, J.-R.; Baek, E.; Kwon, B.-M.; Bok, S.-H.; Jung, T.-S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7582-7588.

New Acetylenic Enol Ethers of Glycerol from the Sponge *Petrosia* sp.

Youngwan Seo, Ki Woong Cho, Hyi-Seung Lee, Jung-Rae Rho, and Jongheon Shin*

Marine Natural Products Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea

Received August 14, 1998

Ten acetylenic enol ethers of glycerols, including six new compounds (1–6) and a linear acetylenic alcohol (7), have been isolated from a sponge of the genus *Petrosia*. The structures of the novel compounds were elucidated by spectroscopic methods. The absolute stereochemistry of 1–7 was determined by chemical transformations and the Mosher method. Some of these compounds exhibited weak cytotoxicity against a human leukemia cell-line (K-562).

Acetylenic and polyacetylenic compounds are a rapidly growing class of sponge metabolites and exhibit great structural variations in both chain length and functional groups.^{1–12} Several sponge-derived acetylenes and polyacetylenes exhibit diverse and potent bioactivity.^{2–12}

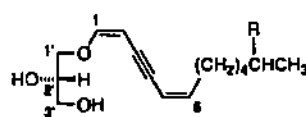
In the course of a search for bioactive substances from marine organisms of Korean origin, we have reported the structures and bioactivities of several petrocortynes and petrosiacetylenes, novel polyacetylenes from an undescribed sponge of the genus *Petrosia* (Nepheliospongiidae) collected from Keomun Island.¹² In addition to petrocortynes and petrosiacetylenes, ¹H NMR analysis of chromatographic fractions of the crude extract of the above sponge revealed the presence of several metabolites of another structural class in more polar fractions. In this paper, we wish to report the structure elucidation and bioactivity of 10 acetylenic enol ethers of glycerol, including six new compounds (1–6) and a new acetylenic alcohol (7). All of the acetylenic enol ethers of glycerol are structurally similar to the raspailynes previously isolated from the sponges *Raspailia pumila* and *Raspailia ramosa*.^{13–15} The acetylenic alcohol (7) contained a linear C₁₂ carbon framework, which is reminiscent of those of the petrocortynes.¹²

Results and Discussion

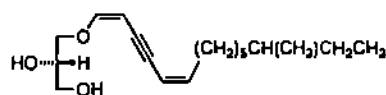
The sponge was collected and processed as described in the Experimental Section to yield 11 metabolites. The structures of four known metabolites, raspailyne B1, raspailyne B2, isoraspailyne B, and isoraspailyne B1, were determined by a combination of spectroscopic analysis and comparison with reported data for these compounds.¹⁴

Compound 1 was isolated as a colorless gum. The molecular formula for this compound was deduced as C₁₅H₂₄O₃ by a combination of HRMS and ¹³C NMR analysis. The spectral data of 1 were very similar to those obtained for raspailyne B2, with the absence of NMR signals of the upfield methylene in both of the ¹³C and ¹H NMR spectra as the only noticeable differences (Table 1). A combination of ¹H COSY, HMQC, and HMBC NMR experiments allowed the determination of the structure of 1 as a linear glyceryl enol ether containing an enyne-diene group.

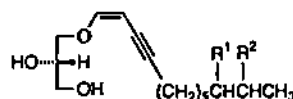
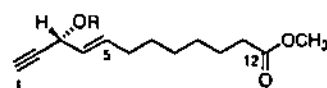
Compound 1 possessed an asymmetric carbon at C-2' of the glycerol moiety. Stereochemical assignment at this carbon, as well as confirmation of the whole molecular structure, was achieved by chemical transformations



1 R = H

2 R = CH₃

3

4 R¹ = R² = H5 R¹ = CH₃, R² = H6 R¹ = H, R² = CH₃

7 R = H

7S R = (S)-MTPA

7R R = (R)-MTPA

(Scheme 1). Catalytic hydrogenation of 1 quantitatively yielded the perhydrogenated derivative 8. This compound was also obtained by treatment of (*R*)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol with bromododecane in DMF followed by acidic hydrolysis, as indicated by the NMR data obtained. The optical rotation of compound 8 was almost negligible, and, therefore, the absolute configuration at C-2' was not satisfactorily assigned. However, both samples of compound 8 were acetylated with acetic anhydride in pyridine, and the optical rotations of the 2',3'-diacetylated products obtained proved that these were indeed the same compound 9, and the 2'S configuration was assigned for 1. Thus, the structure of 1 was unambiguously determined as an acetylenic enol ether of a glycerol.

A related metabolite (2) was isolated as a colorless gum, which analyzed for C₁₆H₂₆O₃ by HRMS and ¹³C NMR

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 82 (345) 400-6170. Fax: 82 (345) 405 4493. E-mail: jshin@vari.kordi.re.kr.

be either a biogenetic degradation product or a precursor of the petrocortynes.

Sponge-derived acetylenes and related compounds are widely recognized for potent and diverse bioactivity.^{12-17, 21, 22} In our measurement of bioactivities of glyceryl enol ether compounds, 1-3 of the yne-diene series exhibited weak cytotoxicity against the human leukemia cell-line K-562 (LC₅₀ 9.2, 57, 29 μg/mL, for 1-3, respectively), while 4-6, possessing the yne-ene group, were not active (LC₅₀ > 100 μg/mL).

Experimental Section

General Experimental Procedures. The optical rotations were measured on a JASCO digital polarimeter using a 5-cm cell. IR spectra were recorded on a Mattson Galaxy spectrophotometer. UV spectra were obtained in MeOH using a Milton-Roy spectrophotometer. NMR spectra were recorded in CDCl₃ and CD₃OD solutions on a Varian Unity 500 spectrometer. Proton and carbon NMR spectra were measured at 500 and 125 MHz, respectively. All of the chemical shifts were recorded with respect to internal Me₄Si. MS were provided by the Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside, and Korea Basic Science Institute, Taejeon, Korea. All solvents used were spectral grade or were distilled from glass prior to use.

Animal Material. The specimens of *Petrosia* sp. (sample number 94K-13) were collected by hand using Scuba at a depth of 20-30 m depth in October 1994 and November 1995, along the shore of Keomun Island, Korea.²³ Morphologically this sponge is very similar to *P. corticata*, but differs in possessing only oxans and no large stronglytotes as spicules. Details of morphological characters were reported previously.¹²

Extraction and Isolation. The freshly collected samples were immediately frozen and kept at -25 °C until investigated chemically. The sponge (5.5 kg, wet wt) was defrosted, uncerated, and extracted with MeOH (6 L × 2) and CH₂Cl₂ (6 L × 2). The combined crude extracts (353.41 g) were partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. The CH₂Cl₂ layer (100.61 g) was concentrated in vacuo, and the residue was repartitioned between *n*-hexane (71.20 g) and 15% aqueous MeOH (28.53 g). An aliquot (8.12 g) of the aqueous MeOH layer was dried and subjected to C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography using sequential mixtures of MeOH and H₂O as eluents (elution order: 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100% MeOH, and EtOAc). The fraction (0.88 g) eluted with 20% aqueous MeOH was dried and separated by reversed-phase HPLC (YMC ODS-A column, 15% aqueous MeOH) to yield, in order of elution, 7, 1, 4, 2, raspaillyne B2, 6, 5, and raspaillyne B1. Final purification was made by reversed-phase HPLC (YMC ODS-A column, 30% aqueous MeCN) to afford 7.3, 9.4, 13.1, 10.4, 6.2, 4.2, 6.4, and 5.0 mg of raspaillynes B1 and B2, 1, 2, and 4-7 as colorless gums, respectively.

The fraction (0.30 g) eluted with 10% aqueous MeOH from vacuum flash chromatography was dried and separated by reversed-phase HPLC (15% aqueous MeOH) to yield, in order of elution, isoraspaillyne B1, raspaillyne B2, 3, and isoraspaillyne B. Further purification was made by reversed-phase HPLC (30% aqueous MeCN) to afford 12.5, 6.0, 3.8, and 5.7 mg of pure raspaillyne B2, isoraspaillynes B and B1, and 3 as colorless gums, respectively.

Raspaillyne B1: [α]_D²⁵ -3.2° (c 0.08, MeOH); lit. value¹⁴ -4.9° (c 0.47, CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR and HRMS data were comparable with reported ones.

Raspaillyne B2: [α]_D²⁵ -4.1° (c 0.40, MeOH); lit. value¹⁴ -10.8° (c 0.066, CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR and HRMS data were comparable with reported ones.

Isoraspaillyne B: [α]_D²⁵ -2.3° (c 0.08, MeOH); ¹H and ¹³C NMR and HRMS data comparable with reported ones.

Isoraspaillyne B1: [α]_D²⁵ +1.0° (c 0.10, MeOH); ¹H and ¹³C NMR and HRMS data comparable with reported ones.

Petroraspaillyne A1 (1): [α]_D²⁵ -3.2° (c 0.08, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 276 (3.74), 291 (3.58) nm; IR (KBr) ν_{max}

3450 (br), 2925, 2860, 2160 (weak), 1630, 1560, 1260, 1100, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.45 (1H, d, J = 6.3 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, J = 10.8, 7.3 Hz, H-6), 5.55 (1H, brd, J = 10.8 Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, J = 6.3, 2.4 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, J = 10.7, 4.6 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, J = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, J = 7.3, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.40 (2H, m, H-8), 1.31 (6H, m, H-9, -10, -11), 0.90 (3H, t, J = 7.1 Hz, H-12); ¹³C NMR, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-1, C-4, C-5, C-6; H-5/C-3, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7, C-8; H-7/C-5, C-6, C-8(9); H-12/C-10, C-11; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFADMS [M + Na]⁺ m/z 275.1627 (calcd C₁₅H₂₄O₃Na 275.1623).

Petroraspaillyne A2 (2): [α]_D²⁵ -3.2° (c 0.40, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 275 (3.82), 291 (3.64) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2925, 2860, 2180, 1630, 1460, 1370, 1160, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.45 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, J = 10.7, 7.6 Hz, H-6), 5.56 (1H, brd, J = 10.7 Hz, H-5), 4.62 (1H, dd, J = 6.8, 2.5 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, J = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, J = 10.7, 6.4 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, J = 11.2, 5.9 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, J = 7.6, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.52 (1H, m, H-11), 1.37 (2H, m, H-8), 1.33 (2H, m, H-9), 1.20 (2H, m, H-10), 0.88 (6H, d, J = 6.4 Hz, H-12, -13); ¹³C NMR, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-4; H-7/C-5, C-6, C-8; H-12(13)/C-10, C-11, C-13(12); H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFADMS [M]⁺ m/z 266.1879 (calcd C₁₆H₂₆O₃ 266.1882).

Petroraspaillyne A3 (3): [α]_D²⁵ +2.6° (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 276 (3.92), 290 (3.74) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2960, 2925, 2855, 2180, 1630, 1460, 1375, 1270, 1090, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.45 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-1), 5.82 (1H, dt, J = 10.8, 7.3 Hz, H-6), 5.56 (1H, br d, J = 10.8 Hz, H-5), 4.61 (1H, dd, J = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, J = 11.2, 4.9 Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, J = 11.2, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.30 (2H, ddt, J = 7.3, 1.5, 7.3 Hz, H-7), 1.41 (2H, m, H-8), 1.36 (2H, m, H-13), 1.33 (1H, m, H-11), 1.31 (5H, m, H-9, -10, -12), 1.12 (1H, m, H-11), 0.87 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-14), 0.86 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-15); ¹³C NMR, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3; H-2/C-1, C-4; H-5/C-3, C-6, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7; H-7/C-5, C-6, C-8; H-14/C-12, C-13; H-15/C-11, C-12, C-13; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFADMS [M+Na]⁺ m/z 317.2096 (calcd C₁₈H₂₈O₃Na 317.2093).

Petroraspaillyne B1 (4): [α]_D²⁵ +0.5° (c 0.21, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 237 (3.57) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2930, 2860, 1635, 1460, 1375, 1280, 1160, 1090 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.36 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, J = 6.8, 2.2 Hz, H-2), 3.96 (1H, dd, J = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, J = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.80 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 2.29 (2H, dt, J = 2.2, 7.0 Hz, H-5), 1.51 (2H, quin, J = 7.0 Hz, H-6), 1.42 (2H, m, H-7), 1.31 (8H, m, H-8, -9, -10, -11), 0.90 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-12); ¹³C NMR, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-1, C-4; H-5/C-1, C-2, C-3, C-4, C-6(7); H-6/C-4, C-5; H-12/C-10, C-11; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFADMS [M + Na]⁺ m/z 277.1794 (calcd C₁₅H₂₆O₃Na 277.1780).

Petroraspaillyne B2 (5): [α]_D²⁵ +5.5° (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 238 (3.51) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2930, 2860, 1635, 1460, 1400, 1160, 1090 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.35 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, J = 6.4, 2.4 Hz, H-2), 3.96 (1H, dd, J = 10.7, 4.9 Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, J = 10.7, 5.9 Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.61 (1H, dd, J = 11.2, 5.4 Hz, H-3'), 3.55 (1H, dd, J = 11.2, 5.9 Hz, H-3'), 2.29 (2H, dt, J = 2.4, 6.8 Hz, H-5), 1.51 (2H, quin, J = 6.8 Hz, H-6), 1.40 (2H, m, H-7), 1.32 (6H, m, H-8, -9, -10, -11), 1.14 (1H, m, H-9), 0.88 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-12), 0.87 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-13); ¹³C NMR, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3; H-5/C-1, C-2, C-3, C-4; H-6/C-4, C-5; H-12/C-10, C-11; H-13/C-9, C-10, C-11; H-1'/C-1, C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-2'; HRFADMS [M + Na]⁺ m/z 291.1942 (calcd C₁₇H₂₈O₃Na 291.1936).

Petroaspaillyne B3 (6): $[\alpha]_D^{25} +3.7^\circ$ (c 0.30, MeOH), UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 238 (3.57) nm; IR (KBr) ν_{max} 3400 (br), 2930, 2860, 2200 (weak), 1635, 1460, 1325, 1160, 1090, 1050 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.36 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1), 4.44 (1H, dt, $J = 6.4, 2.4$ Hz, H-2), 3.97 (1H, dd, $J = 10.7, 4.8$ Hz, H-1'), 3.88 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.81 (1H, m, H-2'), 3.62 (1H, dd, $J = 11.2, 6.4$ Hz, H-3'), 3.56 (1H, dd, $J = 11.2, 6.4$ Hz, H-3'), 2.30 (2H, dt, $J = 2.0, 6.8$ Hz, H-5), 1.63 (1H, m, H-11), 1.51 (2H, m, H-6), 1.32 (6H, m, H-7, -8, -9), 1.20 (2H, dt, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-10), 0.89 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12, -13); $^{13}\text{C NMR}$, see Table 1; HMBC correlations H-1/C-2, C-3, C-1'; H-2/C-1, C-4; H-5/C-3, C-4, C-6(7); H-6/C-5, C-7(8), H-11/C-12(13); H-12(13)/C-10, C-11; H-1'/C-2', C-3'; H-2'/C-1', C-3'; H-3'/C-1', C-2'; HRFABMS $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$ 291.1950 (calcd $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$ 291.1936).

Petrynol (7): $[\alpha]_D^{25} +15.3^\circ$ (c 0.08, CHCl_3); IR (KBr) ν_{max} 3350 (br), 2925, 2870, 1740, 1620, 1440, 1205, 1010 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.88 (1H, dt, $J = 15.1, 6.8$ Hz, H-5), 5.59 (1H, dt, $J = 15.1, 6.1$ Hz, H-4), 4.82 (1H, m, H-3), 3.65 (3H, s, OMe), 2.54 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.29 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11), 2.05 (2H, dt, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-6), 1.84 (1H, br s, OH), 1.59 (2H, m, H-10), 1.39 (2H, t, $J = 7.3, 6.8$ Hz, H-7), 1.30 (4H, m, H-8, H-9); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 174.2 (C, C-12), 134.3 (CH, C-5), 128.5 (CH, C-4), 83.3 (C, C-2), 74.0 (CH, C-1), 62.8 (CH, C-3), 51.5 (CH₃, OMe), 34.1 (CH₂, C-11), 31.8 (CH₂, C-6), 28.9 (CH₂, C-8), 28.7 (CH₂, C-9), 28.5 (CH₂, C-7), 24.9 (CH₂, C-10); HMBC correlations H-1/C-3; H-3/C-1, C-2, C-4, C-5; H-4/C-2, C-3, C-6; H-5/C-3, C-6, C-7; H-6/C-4, C-5, C-7; H-11/C-9, C-10, C-12; OMe/C-12, HRCIMS $[\text{M} + \text{NH}_4]^+ m/z$ 242.1762 (calcd $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}$, 242.1756).

Hydrogenation of 1. To a stirred solution of 4.8 mg of 1 in 1 mL of dry MeOH, 4 mg of 10% palladium charcoal were added. The mixture was stirred under a H_2 atmosphere for 15 h at room temperature. After removing the catalyst by filtration through a glass filter, evaporation under vacuum gave 4.6 mg of pure 8 as a colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -0.5^\circ$ (c 0.09, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 3.73 (1H, m, H-2'), 3.57 (1H, dd, $J = 11.2, 4.9$ Hz, H-3'), 3.50 (1H, dd, $J = 11.2, 5.9$ Hz, H-3'), 3.47 (1H, dd, $J = 10.0, 4.9$ Hz, H-1'), 3.45 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-1), 3.40 (1H, dd, $J = 10.0, 6.1$ Hz, H-1'), 1.56 (2H, m, H-2), 1.33 (2H, m, H-3), 1.28 (16H, m), 0.89 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-12), $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ 73.2 (CH₂, C-1'), 72.6 (CH₂, C-1), 72.3 (CH, C-2'), 64.6 (CH₂, C-3'), 33.1 (CH₂, C-10), 30.8 (CH₂ \times 2), 30.7 (CH₂ \times 3), 30.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 27.2 (CH₂, C-2), 23.8 (CH₂, C-11), 14.5 (CH₃, C-12); HREIMS $[\text{M}]^+ m/z$ 260.2356 (calcd $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 260.2351).

Acetylation of 8. To a stirred solution of 3.5 mg of 8 in 0.3 mL of dry pyridine, 0.2 mL of Ac_2O were added. After stirring the mixture for 3 h at room temperature, the solvent and excess reactant were removed by blowing with N_2 . Separation by reversed-phase HPLC (YMC ODS column, MeCN) gave 2.7 mg of pure 9 as a colorless solid; mp 45–47°; $[\alpha]_D^{25} -11.6^\circ$ (c 0.16, MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 5.15 (1H, m, H-2'), 4.32 (1H, dd, $J = 11.8, 3.8$ Hz, H-3'), 4.12 (1H, dd, $J = 11.8, 6.8$ Hz, H-3'), 3.57 (1H, dd, $J = 10.7, 5.9$ Hz, H-1'), 3.54 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-1'), 3.47 (1H, dt, $J = 9.5, 6.6$ Hz, H-1), 3.43 (1H, dt, $J = 9.5, 6.6$ Hz, H-1), 2.04 (3H, s, OAc), 2.03 (3H, s, OAc), 1.56 (2H, m, H-2), 1.33 (2H, m, H-3), 1.28 (16H, m), 0.89 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-12).

Synthesis of (S)-1,2-Diacetoxy-3-dodecyloxypropane-1,2-diol (9). To a stirred solution of 116 mg of (R)-(-)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol in 10 mL of DMF was added 23 mg of NaH. After refluxing the mixture for 1 h, 0.3 mL of bromododecane was added by syringe. The mixture was refluxed for 3 h, and the solvent removed under vacuum and the residue partitioned between Et_2O and H_2O . The ether layer was dried, and the residue was redissolved in 30 mL of THF. On the addition of 5 mL of 10% HCl, the mixture was stirred overnight at room temperature. After removing the solvent under vacuum, separation by silica column chromatography (1 \times 17 cm, 50% EtOAc in hexane) gave pure (S)-3-dodecyloxypropane-1,2-diol (8): $[\alpha]_D^{25} -0.1^\circ$ (c 1.1, MeOH). Acetylation of this compound was performed by using the same method as for 8. From 21.0 mg of (S)-3-dodecyloxypropane-1,2-diol was obtained 17.2 mg of (S)-1,2-diacetoxy-3-dodecy-

loxypropane-1,2-diol (9). The $^1\text{H NMR}$ data of this compound were identical with those of 9: $[\alpha]_D^{25} -9.6^\circ$ (c 1.15, MeOH).

(S)-MTPA Ester of 7. To a stirred solution of 1.7 mg of 7 in 0.3 mL of dry pyridine was added 20 μL of (-)-MTPA chloride. After stirring the mixture under N_2 at room temperature for 1 h, the solvent was removed by blowing with N_2 . The residue was redissolved in 2 mL of 30% EtOAc-hexane and filtered through a Sep-Pak silica column. After removing the solvent under vacuum, the residue was separated by reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 100% MeCN) to yield 1.1 mg of 7S as a colorless gum: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.54 (2H, m, Ar), 7.43–7.41 (3H, m, Ar), 6.07 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 6.01 (1H, br dd, $J = 6.8, 2.0$ Hz, H-3), 5.60 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 3.66 (3H, s, OMe), 3.56 (3H, s, OMe), 2.59 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.30 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-11), 2.09 (2H, ddt, $J = 6.8, 1.5, 7.3$ Hz, H-6), 1.61 (2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.40 (2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-7), 1.31–1.29 (4H, m, H-8, -9); HRFABMS $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$ 463.1731 (calcd $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{O}_5\text{Na}$ 463.1708).

(R)-MTPA Ester of 7. Prepared as described for 7S. From 1.1 mg of 7 and 20 mL of (+)-MTPA chloride was obtained 0.9 mg of 7R as a colorless gum: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.54 (2H, m, Ar), 7.44–7.38 (3H, m, Ar), 6.03 (1H, br d, $J = 6.8$ Hz, H-3), 6.00 (1H, ddt, $J = 15.1, 1.0, 6.8$ Hz, H-5), 5.50 (1H, ddt, $J = 15.1, 6.8, 1.5$ Hz, H-4), 3.66 (3H, s, OMe), 3.59 (3H, s, OMe), 2.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-1), 2.30 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-11), 2.05 (2H, ddt, $J = 6.8, 1.5, 7.3$ Hz, H-6), 1.60 (2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-10), 1.37 (2H, quin, $J = 7.3$ Hz, H-7), 1.29 (4H, m, H-8, -9); $\Delta(\delta 7S - \delta 7R)$ H-1, -20.5 Hz; H-3, -8.8 Hz; H-4, +52.7 Hz; H-5, +32.3 Hz; H-6, +19.8 Hz; H-7, +16.1 Hz; H-10, +2.9 Hz; H-11, +1.5 Hz.

Cytotoxicity Assay.²² The human leukemia cell (K-562) was cultivated in a medium (RPMI 1640 including 10% FBS and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of kanamycin) at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. The cells were harvested by centrifugation at 1500 rpm for 5 min and washed with PBS buffer to remove the medium. Using a hemocytometer under an inverted microscope, the cells were counted and suspended (2 \times 10⁶ cells/mL) in a new medium of the same constituents. The newly suspended cells were distributed into a 96-well microplate (0.1 mL each), and samples dissolved in DMSO (series of sequential ten-fold dilution, 0.1 mL each) were added. The suspensions were incubated at 37 °C under 5% CO_2 for 5 days. On the addition of MTT solution (1.1 mg/mL of stock solution, 50 μL each), the suspensions were incubated for 4 h under the same condition. After removing the supernatant with microplate washer, 0.15 mL of DMSO was added to dissolve formazan. The absorbance was measured at 540 nm with a microplate reader (Bio-Rad Model 3550) and IC₅₀ value was calculated.

Acknowledgment. The authors thank Dr. Hosung Chung, Polar Research Center, KORDI, for assistance with collecting sponge samples. Taxonomic assignment provided by Professor Chung J. Sim, Department of Biology, Han Nam University, Taejeon, Korea is gratefully acknowledged. MS data were kindly provided by Drs. Richard Kondrat, Ron New (The Mass Spectrometry Facility, Department of Chemistry, University of California, Riverside) and Young Ilwan Kim (Korea Basic Science Institute, Taejeon, Korea). Special thanks go to Mr. Dong I. Lee for assistance with laboratory work. This research was financially supported by grants (BSPN-00332 and -97363) from Ministry of Science and Technology, Korea.

References and Notes

- Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* 1997, 11, 259–302, and references therein.
- Kobayashi, M.; Mahmud, T.; Tajima, H.; Wang, W.; Aoki, S.; Nakagawa, S.; Mayumi, T.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1996, 44, 720–724.
- Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 88–89.
- Dai, J.-R.; Hallock, Y. F.; Cardellina, J. H., II; Gray, C. N.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 860–865.
- Ortega, M. J.; Zubia, E.; Carballea, J. I.; Salva, J. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1069–1071.
- Williams, D. H.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1099–1101.

- (7) Uno, M., Ohta, S.; Ohta, E.; Ikegami, S. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1146-1148
- (8) Fu, X.; Abbas, S. A.; Schmitz, F. J.; Vidavsky, I.; Gross, M. L.; Laney, M.; Schatzman, R. C.; Calvelley, R. D. *Tetrahedron* 1997, 53, 799-814
- (9) Takamitsu S.; Kato, H.; Hara, D.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 126-130
- (10) Uchiyama, A.; Nagano, G.; Arakawa, S. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 131-133
- (11) Guo, Y.; Cavagnin, M.; Salerno, C.; Cimino, G. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 333-337
- (12) Seo, Y.; Cho, K. W.; Rho, J.-R.; Shin, J.; Sim, C. J. *Tetrahedron* 1998, 54, 447-462
- (13) Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Chem. Commun.* 1986, 77-78
- (14) Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 1050-1062
- (15) Guella, G.; Mancini, I.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 1400-1411
- (16) Perry, N. D.; Becker, E. G.; Biant, J. W.; Lake, R. J.; Munro, M. H. G. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 732-734.
- (17) Iguchi, K.; Kitade, M.; Kaaliwagi, T.; Yamada, Y. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 5630-5638
- (18) Mancini, I.; Guella, G.; Pietra, F.; Amade, P. *Tetrahedron* 1997, 53, 2625-2628
- (19) Ohtani, I.; Kawami, T.; Kishimoto, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4092-4096
- (20) Beraart, M. W.; Hallock, Y. F.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 993-994
- (21) The voucher specimens (registry no. Por. 27) are deposited in the sponge collection, Natural History Museum, Hanyang University, Taejeon, Korea under the curatorship of Professor Chung J. Sim
- (22) Jakoby, W.; Pastan, I., Eds; *Methods in Enzymology*; Academic: New York, 1973; Vol. 58.

NP9803575

