

해면 *Spongia* sp.의 화학적 성분 연구

朴善求* · 吳制錫† · Paul J. Scheuer‡

국립환경연구원 영산강수질검사소

†한국과학기술연구원 응용과학부

‡하와이대학교 화학과

(1994. 7. 12 접수)

The Chemical Constituents from the Sponge *Spongia* sp.

Sun Ku Park*, Changsok Oh†, and Paul J. Scheuer‡

Yeongsan River Water Resource Research Institute

National Institute of Environmental Research

813 Woosan-Ri Songkwang-Myon Syunchun-City, Jeunranam-Do, Korea

†Division of Applied Science, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

‡Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa,

2545 The Mall, Honolulu, HI, 96822

(Received July 12, 1994)

요 약. 인도네시아 Manado만의 Sulawesi에서 채집한 해면 *Spongia* sp.로부터 KB Cancer cell line에 대하여 활성을 갖는 halenaquinone, epispongiatriol 및 aldisin을 분리하였다. 이들의 구조를 ^1H , ^{13}C NMR, ^1H ^{13}C (1 bond) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy(HMQC), ^1H ^{13}C (2 and 3 bond) Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy(HMBC),² Electron Impact Mass Spectroscopy (EI ms) 및 IR로 밝혔다.

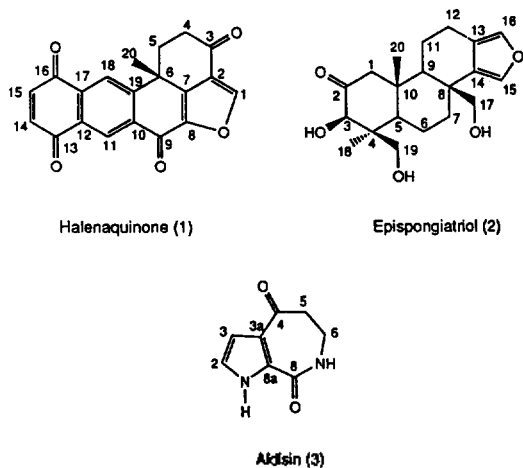
ABSTRACT. The cytotoxic metabolites, against the KB cell line, halenaquinone, epispongiatriol and aldisin were isolated from the sponge *Spongia* sp. collected in September 1992, Manado Bay, Sulawesi in Indonesia. Their structures were elucidated by ^1H , ^{13}C NMR, ^1H ^{13}C (1 bond) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy (HMQC), ^1H ^{13}C (2 and 3 bond) Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy (HMBC),² Electron Impact Mass Spectroscopy (EI ms) and Infrared Spectroscopy (IR).

서 론

천연물 의약품 자원에 대한 연구가 주로 육상 생물에 치우쳐 왔지만 근래에는 해양자원으로부터 새로운 의약품 자원의 개발에 관심이 집중되고 있다. 또한 새로운 질병들이 발생됨에 따라 이에 대한 치료제 개발이 절실히 요구되면서 해양생물로부터 항박테리아, 항바이러스, 항암효과를 갖는 화합물이 발견되고 있어 해양생물에 대한 관심이 크게 고조되고 있다. 그 중 해면에는 생리활성이 선택적으로 큰 화합물들이 다양하게 포함되어 있어 큰 관심의 대상이 되고 있다. 한 예로써 Jaspamide은 해면 Jas-

pis 중에서 발견된 성분으로 살균, 항생, 항암 등 매우 특이한 생리작용이 있어 주목을 받고 있는 depsipeptide의 하나이다.³

본 연구에서는 인도네시아의 Manado만 Sulawesi에서 채집한 해면 *Spongia* sp.의 디클로로메탄-이소프로필 알코올(1:1) 추출물로부터 생리활성이 있는 물질을 분리해 그 구조를 밝히려 하였다. 이 추출물을 *in vitro*로 KB cancer cell line에 대해 시험한 결과 활성(MIC, 1 mg/mL, 2⁺)을 갖게 되어 연구를 하게 되었으며, 새로운 기법인 2D NMR 기술중의 하나인 HMBC를 이용하여 기존의 방법보다



간편하고도 정확하게 구조를 결정할 수 있었다.

실 험

^1H NMR(500 MHz) 및 ^{13}C NMR(125 MHz) 스펙트럼은 General Electric GN 500을 사용했으며, 용매로는 CDCl_3 (δ 7.2), $\text{DMSO}-d_6$ (δ 2.6), $\text{Pyridine}-d_5$ (δ 8.7, 7.6, 7.2)를 사용했다.

Halenaquinone(1)에 대한 HMBC 조건

Sample 농도 = 18 mg/ CDCl_3 0.6 mL, 256 of blocks \times 2048 data matrix with 48 of scan per t_1 increment, 5.0 delay period for long-range couplings, 100° shifted sine bell squared filtering for t_1 and 4700 Hz line broadening for it.

Epispongiatriol(2)에 대한 HMBC 조건

Sample 농도 = 22 mg/ $\text{DMSO}-d_6$ 0.5 mL, 256 of blocks \times 2048 data matrix with 112 of scan per t_1 increment, 3.0 delay period for long-range couplings, 100° shifted sine bell squared filtering for t_1 and 5300 Hz line broadening for it.

IR spectrometer는 Perkin-Elmer사의 Model 1420을 사용했다. Mass spectra는 VG-70SE magnetic sector mass spectrometer로부터 얻었으며, 분리를 위한 HPLC로는 Water사의 Model 441을 사용했으며, column은 YMC-guardpack ODS-A, 30×10 mm I.D., S-5 mm, 120A, microsorb Si, 80-199-C5, G9 10041 및 Econosphere CN, 250×4.6 mm, 5 micron을 사용했다. HPLC 사용전 정제물

Table 1. NMR data for halenaquinone at 500 MHz in CDCl_3

Position	^1H NMR	^{13}C NMR	HMBC
1	8.28(1H, s)	149.26	2,7
2		122.50	
3		190.91	
4	3.07~2.99(1H, m) 2.86~2.83(1H, m)	36.40	2,3,5,6
5	2.89~2.87(1H, m) 2.32~2.25(1H, m)	33.36	2,3,4,6,7,19,20
6		36.70	
7		147.41	
8		144.90	
9		170.24	
10		137.21	
11	9.06(1H, s)	127.42	9,13,17,19
12		130.80	
13		183.48	
14	7.08(1H, s)	139.44	13
15	7.07(1H, s)	138.72	16
16		184.32	
17		133.78	
18	8.27(1H, s)	123.75	10,12,16,17,19
19		153.96	
20	1.69(3H, s)	30.73	5,6,7,19

위한 Bond Elut로는 Varian C_{18} 1210-2028, Si 1210-2037을 사용했으며, TLC는 Merck RP- C_{18} F₂₅₄ S와 Sigma T-6270 Lot 21H0126을 사용하였고, UV lamp, vanillin 용액 및 진한 황산 spray 등으로 확인했다. 모든 유기 용매와 초자는 증류, 건조하여 사용했으며, 시약은 GR급을 사용했다.

Halenaquinone(1). EI ms, M/z , 332(M^+), 304($M^+ - \text{CO}$), 278($M^+ - \text{CO} - \text{H}_2\text{O}$); IR(KBr) ν_{max} 3150~3000, 1710, 1676, 1668, 1615, 1470, 1320 cm^{-1} ; ^1H 및 ^{13}C NMR 자료는 Table 1 참조.

Epispongiatriol(2). EI ms, m/z (%), 348(M^+ , 8), 317($M^+ - \text{CH}_2\text{OH}$, 28), 300(14), 299($M^+ - \text{CH}_2\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$, 7), 287(33), 285(14), 270(26), 269(100), 227(11), 161(22), 147(66), 135(54), 133(49), 91(45), 69(53); IR(KBr) ν_{max} 3425, 2930, 1718, 1035, 887 cm^{-1} ; ^1H 및 ^{13}C NMR 자료는 Table 2 참조.

Aldisin(3). EI ms m/z (%), 164(M^+ , 28), 136($M^+ - \text{C}_2\text{H}_4$, 9), 107($M^+ - \text{CH}_2\text{NHCO}$, 15), 93($M^+ - \text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$,

Table 2. NMR data for epispongiatriol at 500 MHz in pyridine- d_5

Position	^1H NMR	^{13}C NMR	HMBC
1	2.70(1H, d, $J=12.3$ Hz) 2.15(1H, d, $J=12.3$ Hz)	54.17	2,3,9,20
2		210.47	
3	4.35(1H, s)	84.34	2,4,18,19
4		49.52	
5	1.75(1H, dd, $J=12.3,$ 2.3 Hz)	55.93	1,3,4,6,7,9,10 18,19,20
6	2.03(1H, m) 1.86(1H, m)	19.81	5,7,8,10
7	2.83(1H, t, $J=3.0$ Hz) 1.35(1H, m)	35.68	5,6,8,14,17
8		40.88	
9	1.55(1H, dd, $J=12.4,$ 1.5 Hz)	56.62	8,10,12,14 17,20
10		40.05	
11	1.70(1H, s) 1.53(1H, m)	18.32	8,9,10,12,13
12	2.72(1H, dd, $J=12.3$ 4.7 Hz) 2.49(1H, m)	20.75	11,13,14,16
13		120.53	
14		131.49	
15	7.55(1H, brs)	138.62	13,14
16	7.30(1H, d, $J=1.5$ Hz)	137.22	13,14
17	4.12(1H, d, $J=10.5$ Hz) 3.73(1H, d, $J=10.5$ Hz)	62.22	7,8,14
18	1.60(3H, s)	24.12	3,4,5,19
19	4.08(1H, d, $J=11.3$ Hz) 3.77(1H, d, $J=11.3$ Hz)	64.29	2,4,5,18
20	1.11(3H, s)	17.73	1,9,10

s: singlet, d: doublet, dd: doublet of doublet, t: triplet, brs: broad singlet, m: multiplet.

21), 84(100); IR(KBr), ν_{max} 3420, 3255, 1660, 1645, 1630, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR(DMSO- d_6) δ 6.96(H-2, d, $J=2.4$ Hz), 6.54(H-3, d, $J=2.4$ Hz), 2.68(2H-5, m), 3.34(2H-6, m), 12.14(NH-1, s), 8.30(NH-7, t, $J=4.1$ Hz); ^{13}C NMR(DMSO- d_6) 194.32(C-4), 162.17(C-8), 123.53(C-8a), 122.33(C-3a), 122.16(C-2), 109.49(C-3), 43.49(C-6), 36.52(C-5).

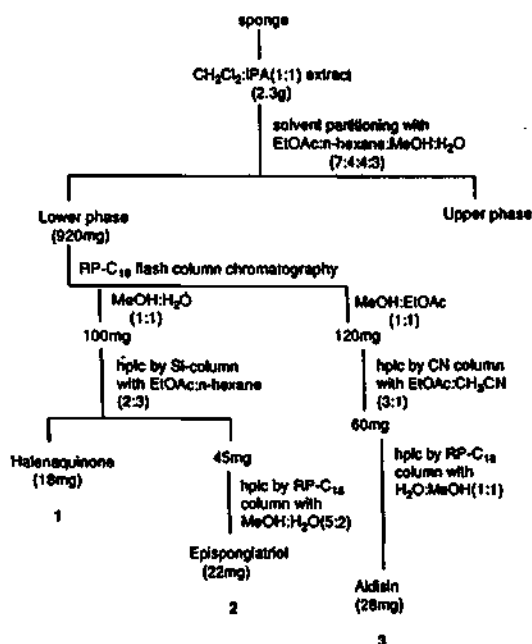
채집과 추출

시료는 1992년 9월 인도네시아의 Manado만 Sulawesi에서 채집된 젖은(fresh) 해면 *Spongia* sp. 450 g을 사용했다. 깨끗한 플라스틱 자루에 젖은 해면을

넣고, 3일 동안 냉동시킨 후, 이들을 성글게 자르고 4일 동안 냉동 건조시켰다. 건조된 해면을 잘게 부순 후 깨끗한 유리병에 담고, 디클로로메탄-이소프로필 알코올(1:1)에 2일간 담가 놓았다. 2일 후 시료로부터 디클로로메탄-이소프로필 알코올(1:1) 추출액을 Büchner funnel을 이용하여 여과한 다음, rotary evaporator로 용매를 제거하였다. 건조된 추출물에 대해 EtOAc : *n*-Hexane : MeOH : H₂O = 7 : 4 : 4 : 3 을 이용한 solvent partitioning을 실시하였으며, 분액깔대기로 유기층과 물층을 분리하였다. 물층을 감압하에서 rotary evaporator로 용매를 제거하여 920 mg의 추출물을 얻었다.

HPLC를 이용한 Halenaquinone(1), Epispongiatriol(2) 및 Aldisin(3)의 분리. 위에서 얻은 물층 추출물(920 mg)을 RP-C₁₈ flash column chromatography하여 MeOH : H₂O(1:1) 분획과 MeOH : EtOAc(1:1) 분획을 얻었다. 이 중 MeOH : H₂O(1:1) 분획(100mg)을 EtOAc : *n*-Hexane = 2.0 : 3.0 용매로 Si column을 사용하여 HPLC를 수행하였다. RI 검출기의 감쇠기, 32X; UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm; 용매 흐름 속도, 2.0 mL/min; chart 속도, 12 cm/hr; 머무른 시간 t_{R1} : 9.8 min에서 화합물(1) (18 mg)과 t_{R2} : 11.8 min에서 혼합물(45 mg)이 얻어졌다. 이 혼합물(45 mg)을 MeOH : H₂O = 5 : 2 용매와 함께 역상-C₁₈ column을 사용하여 반복해서 HPLC를 수행하였다; RI 검출기의 감쇠기, 64X; UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm; 용매 흐름 속도, 1.8 mL/min; chart 속도, 12 cm/hr; 머무른 시간 t_R : 9.5 min에서 화합물(2) (22 mg)을 얻었다. MeOH : EtOAc(1:1) 분획(120 mg)을 EtOAc : CH₃CN(3:1) 용매로 CN column을 사용하여 HPLC를 수행하였다. RI 검출기의 감쇠기, 32X; UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm; 용매 흐름 속도, 1.8 mL/min; chart 속도, 15 cm/hr; 머무른 시간 t_R : 10.8 min에서 혼합물 60 mg이 얻어졌다. 이 혼합물(60 mg)을 MeOH : H₂O = 1 : 1 용매로 역상-C₁₈ column을 사용하여 반복적인 HPLC를 수행하였다. RI 검출기의 감쇠기, 16X; UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm; 용매 흐름 속도, 2.0 mL/min; chart 속도, 12 cm/hr; 머무른 시간 t_R : 10.0 min에서 화합물(3) (28 mg)을 얻었다(Scheme 1).

이를 ^1H , ^{13}C NMR, HMQC, HMBC, EI ms 및



Scheme 1.

IR 스펙트럼으로 확인하였다. Halenaquinone 10 mg/mL, Epispongatriol 1 mg/mL 및 Aldisin 50 mg/mL은 KB cancer cell⁴에 대해 각각 2⁺(25%), 2⁺(25%), 3⁺(75%)의 활성을 갖고 있었다.

결과 및 고찰

인도네시아의 Manado 및 Sulawesi에서 채집한 해면을 시료로 사용하였다. 짙은 해면을 냉동 건조한 다음 용매 EtOAc : n-hexane : MeOH : H₂O = 7 : 4 : 4 : 3을 사용하여 solvent partitioning을 하였다. 유기층과 물층을 분리하여, 물층 추출물은 RP-C₁₈ flash column chromatography를 수행하여 2개의 fraction을 얻었는데, 이중 MeOH : H₂O(1 : 1) 분획을 Si column을 사용하여 HPLC로 분리한 결과 화합물 (1)과 혼합물이 얻어졌다. 이 혼합물을 역상-C₁₈ column을 이용한 반복적인 HPLC로 분리 정제하여 화합물(2)을 얻었다. 또 다른 MeOH : EtOAc(1 : 1) 분획을 CN column 과 역상-C₁₈ column으로 반복적인 HPLC를 수행하여 화합물(3)을 얻었다. KB cancer cell line에 대해 활성을 갖는 화합물(1), (2), 및 (3)을 ¹H, ¹³C NMR, HMQC, HMBC, EI ms 및 IR로 분석하여 각각의 화합물이 halenaquinone(1),

epispongatriol(2) 및 aldisin(3)임을 확인하였다.

1983년 D. M. Roll^{5,6} 등은 Okinawan 해안에서 채집한 *Xestospongia exigua* 해면으로부터 halenaquinone을 분리하였으며 이것은 antimicrobial 활성을 갖고 있다.

Halenaquinone(1)의 ¹H NMR 스펙트럼; aromatic C-11 양성자(δ 9.06, 1H, singlet), 카르보닐기와 conjugated된 퓨란 고리의 양성자(δ 8.28, 1H, singlet), 메틸기의 양성자(δ 1.69, 3H, 6-CH₃, singlet), 메틸렌 양성자들에 기인하는 signals [δ 3.07~2.99(1H, m), 2.89~2.87(1H, m), 2.86~2.83(1H, m), 2.32~2.25(1H, m)]; ¹³C NMR 스펙트럼, 카르보닐기의 탄소(δ 190.91, 184.32, 183.48, 170.24), 퓨란 고리의 탄소(δ 149.26, 147.41, 144.90, 122.50), aromatic과 conjugation된 이중결합의 탄소(δ 153.96, 139.44, 138.72, 137.21, 133.78, 130.80, 127.42, 123.75), 메틸렌 탄소(δ 36.40, 33.36), 메틸기의 탄소(δ 30.73)이다(Table 1). 이상의 값은 문헌치⁷와 일치하였다.

D. M. Roll⁵과 H. Nakamura⁶ 등은 ¹³C NMR 데이터 중 탄소-10과 19의 값을 각각 δ 154.1과 136.3으로 보고하였는데, 이는 2 및 3결합의 C-H long range coupling 관계를 나타내는 HMBC로부터 수소-5(δ 2.89~2.87, 2.32~2.25)와 20(δ 1.69)이 탄소-10(δ 137.21)과는 상관관계가 없었으며, 탄소-19(δ 153.96)와는 상관관계가 있는 것으로 보아 위의 보고가 잘못되었음을 추정할 수 있었다.

각각의 탄소위치와 탄소-탄소 연결을 통한 halenaquinone(1)의 구조를 HMBC 스펙트럼으로 확인하였는데, 퓨란 고리의 C-1 양성자는 탄소-2 및 7과 상관관계를 갖고 있으며, 메틸렌 C-4와 C-5 양성자는 각각 탄소-2,3,5,6와 탄소-2,3,4,6,7,19,20, aromatic C-11와 C-18의 양성자는 탄소-9,13,17,19와 탄소-10,12,16,17,19, conjugated된 이중결합의 C-14와 C-15의 양성자는 각각 탄소-13와 탄소-16, 메틸기의 양성자는 탄소-5,6,7,19와 상관관계를 나타냈고, 그 구체적인 NMR 자료는 Table 1에 나타났다.

EI ms 스펙트럼으로부터 분자이온이 332임을 알 수 있었고, 이를 IR로 확인하였는데 여기에 대한 데이터는 다음과 같다; aromatic C-H stretching 진동수 3150~3000 cm⁻¹, aliphatic C-H stretching 진동수 2930, 2890 cm⁻¹, carbonyl의 C=O은 1710,

1676, 1668 cm^{-1} , aromatic C=C 진동수 1615 cm^{-1} , 그리고 1470, 1320 cm^{-1} 에서 나타났다. 이상의 값은 문헌치⁵와 일치하였다.

1982년 J. F. Marwood⁸ 등은 해면에서 얻은 furano-diterpene계의 spongiatriol을 쥐에 대해 활성 실험을 한 결과 혈압 강하와 설사의 활성을 보였으며, 또한 심장혈관과 위장에 미치는 영향에 대해 보고하였다. Epispongiatriol(2)의 ¹H NMR 스펙트럼; 퓨란 고리의 2개 양성자[δ 7.55(1H, brs), 7.30(1H, d, $J=1.5$ Hz)], 퓨란 고리에 근접한 메틸렌의 2개 양성자[δ 2.72(1H, dd, $J=12.3, 4.7$), 2.49(1H, m)], hydroxyl기를 갖는 탄소-19의 두 개 양성자(δ 4.08, 3.77, both 1H), 2개의 메틸기 양성자(δ 1.60, 1.11, both 3H, s), 탄소-17의 2개 양성자는 2개의 doublet (δ 4.12, 3.73, both 1H, $J=10.5$ Hz), 그리고 C-3의 양성자(δ 4.35, 1H, s)의 결과로 보아 탄소 3의 양성자가 α 임을 알 수 있었다. ¹³C NMR 스펙트럼; 카르보닐기의 탄소(δ 210.47), 3,4 위치가 치환된 퓨란 고리의 탄소-13,14(δ 131.49, 120.53), hydroxyl기가 치환된 2개의 탄소(δ 64.29, 62.22), β -hydroxyl기를 갖는 탄소-3(δ 84.34), 2개의 메틸 탄소(δ 24.12, 17.73)이다(Table 2). 이상의 값은 문헌치⁹와 일치하였다.

이 구조는 HMBC 스펙트럼으로 확인하였는데 이것으로부터 탄소-3의 β -양성자는 탄소-2,4,18,19와 상관관계가 있으며, hydroxyl기가 치환된 탄소-17과 19의 메틸렌 양성자는 각각 탄소-7,8,14와 탄소-3,4,5,18, 퓨란 고리의 탄소-16 양성자와 퓨란 고리에 근접한 탄소-12의 메틸렌 양성자는 탄소-13,14과 탄소-11,13,14,16, 2개의 메틸기 탄소-18과 20의 양성자는 탄소-3,4,5,19와 탄소-1,9,10과 상관관계를 나타냈고, 이것의 구체적인 NMR data는 Table 2에 나타났다.

EI ms 스펙트럼으로부터 분자 이온이 348이었음을 알 수 있었고, CH₂OH기와 H₂O가 fragmentation된 peak도 볼 수 있었다. 이를 IR로 확인하였는데, 여

기에 대한 data는 다음과 같다; carbonyl C=O, 1718 cm^{-1} , hydroxyl의 OH, 3425 cm^{-1} , aliphatic C-H stretching 진동수 2930 cm^{-1} .

Aldisin(3)의 ¹H NMR 스펙트럼은 exchangeable 한 양성자[δ 12.4(1H, s), 8.30(1H, t, $J=4.1$ Hz)], pyrrol 양성자인 2개의 doublet(δ 6.96, 2-H, 6.54, 3-H, $J=2.4$ Hz); ¹³C NMR 스펙트럼, conjugation된 케톤과 아마이드의 탄소(δ 194.32, 162.17), pyrrol ring의 탄소(δ 123.53, 122.33, 122.16, 109.49)이다. 이것의 구체적인 데이터는 실험부분에 나타냈고, 문헌치¹⁰와 일치하였다. 또한 EI ms 스펙트럼으로부터 분자량이 164임을 확인하였다.

인 용 문 헌

- Ottig, G.; Wuthrich, K. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 569.
- Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093.
- (a) Scheuer, P. J. *Bioorganic Marine Chemistry*; Springer-Verlagk Berline Heidelberg: New York, 1989; Vol. 3, p 10. (b) Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123.
- Cook, K. M.; Friedberg, E. C. *Biochemistry* **1978**, *17*, 850.
- Roll, D. M.; Scheuer, P. J.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6177.
- Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Kobayashi, M.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. *Chemistry Letters* **1985**, 713.
- Kobayashi, M.; Shimizu, N.; Kyogoku, Y.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 1305.
- Marwood, J. F. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1982**, *60*, 253.
- Kazalaukas, R.; Murphy, P. T.; Wells, R. J.; Noack, K.; Oberhansli, W.; Schonhalzer, P. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 867.
- Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Lakshmi, V.; Tillekeratne, L. M. V. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 47.