Journal of the Korean Chemical Society
1997, *Vol. 41, No. 8*
Printed in the Republic of Korea

단 신

개불의 메탄올 추출물에서 Sterol의 구조 확인

張聖根* · 蔡 碩 · 鄭孝錫 · 朴永鉉†
순천향대학교 화학과
†순천향대학교 식품영양학과
(1997. 5. 23. 접수)

Identification of Sterols from Methanol Extracts of *Urechis unicintus*

Sung-Keun Chang*, Seok Chai, Hyo-Seok Jeong, and Young-Hyun Park†
Department of Chemistry, Soonchunhyang University, Asan-Si 336-745, Korea
†Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan-Si 336-745, Korea
(Received May 23, 1997)

해양은 지구 면적의 71%를 차지하며 50만종 이상의 다양한 생물이 서식하는 천연보고이다. 해양생물은 육상생물과 다른 환경으로 인하여 생체내 2차대사산물의 화학구조가 매우 독특하여 해양 천연물 분야의 연구 대상이 되고 있다.[1-3] 최근 이러한 2차대사산물들은 생리기능이나 생태계의 제어에 중요한 생리활성 물질로서 인식되고 있다.[4]

해양 sterol은 그 구조의 다양성 때문에 생화학적 분류도구(chemotaxonomic tool)로 이용되고 있지만 세포막 구성 성분인 cholesterol보다 낮은 용해도로 인하여 세포막 유동성을 유지한다.[5,6] 그리고, 막 구성성분은 세포의 생리기능 및 제어계에서 세포내 정보전달에 중요한 역할을 한다고 한다. 예를들면 해양 2차대사산물중에 와편모조(*Gambierdiscus toxicus*)에서 분리한 maitotoxin은 세포막 Ca^{2+} channel에 특이적인 작용과 멍게(*Eudistoma olivaceum*)에서 분리한 eudistomin D 유도체는 세포내 Ca^{2+} 유리 촉진 작용과 극피동물(해삼, 불가사리, 섬게)에서 분리한 Asterosaponin 또는 Holothurin 성분 등은 세포막 cholesterol과 친화성이 커서 세포막 변형, 세포내 인산화 그리고 계면활성작용으로 인한 어독 또는 용혈현상이 알려져 있다.[7-12]

개불(*Urechis unicintus*)은 우리나라 서남해안의 갯벌에 서식하는 의충동물로 체강액(coelomic fluid)내 hemoglobin의 생화학 및 발생 형태학적 연구가 보고되고 있지만 2차대사산물에 대한 연구는 부족한 실정이다.[13,14] 그래서, 개불의 methanol추출물에서 사람 및 흰쥐의 혈액세포에 대한 용혈작용이 보고되어 2차대사산물에 대하여 연구하고자 한다.[15]

실험에 사용된 해양생물은 충청남도 서해안 몽산포 갯벌에서 채집한 의충동물인 개불(*Urechis unicintus*)로서 총 704(42.4±3.8 g) 마리를 실험동물로 사용하였다.

서해안 몽산포에서 채집한 해양생물 개불을 체벽(body wall), 내장(viscera), 체강액(coelomic fluid)으로 분리하였다(*Table* 1).

체벽 및 내장은 이물질 제거를 위하여 증류수로 세척한 다음 세절하여 methanol로 추출하여 40°C에서 감압 농축하였다. methanol 추출물을 증류수로 현탁시킨 후 petroleum ether와 dichloromethane 용매순으로 추출하였다.

개불 내장을 dichloromethane으로 추출한 추출물 2 g을 취하여 chloroform에 용해시켜 분취용 얇은 막 크로마토그래피(Aldrich, PREP. TLC, silica, 20 cm × 20 cm × 0.7 mm)를 이용하여 전개용매(benzene: ethyl acetate=4 : 1)로 전개하고, Liebermann-Burchard 발색시약[16,17]으로 적갈색 band(Rf=0.47)를 확인하였다. 이 발색시약은 3β-hydroxy와 5Δ steroid계 물질을 적색에서 적갈색으로 발색시킨다. 이 band를 분취하여 methanol로 추출한 다음 glass filter(Pyrex사, 3G3, USA)

Table 1. Volume and parts of urechis unicintus

Volume \ parts	Body wall	Viscera	Coelomic fluid	Total body
Weight(g)[a]	16.1±0.7	4.4±0.5	21.9±6.7	42.4±3.8
Percent(%)	38.0	10.4	51.6	100

[a]Weight(g): Mean±SD

Compound I
↓ reconstitute in pyridine
TMS-Derivatization with HMDS*/TMCS**
(2:1, v/v) 60 ℃, 1hr
↓ remove excessive reagents
↓ extraction with hexane
GC-Mass

Fig. 1. GC-Mass analysis procedure by compound I derivatization with TMS. (*; Hexamethyldisilazane, **; Trimethylchlorosilane)

로 silica gel을 제거한 여액을 농축한 후 methanol로 재결정하여 흰색 침상결정을 얻었다. 이 결정을 compound I(CI)이라 하였으며, *Fig*. 1, *Table* 2의 방법에 의하여 TMS(Trimethylsilane)화한 다음에 GC-Mass 분석하여 *Fig*. 2, 3, 4, 5과 같은 결과를 얻었다.

Fig. 2에서 보는 것과 같이 CI 혼합물(Rf=.47)을 GC-Mass로 분석한 결과, 4:2:1의 비율로 분리된 3개 단일 peak들이 혼합된 형태로 존재하므로, 그것

Table 2. The operation condition of GC-Mass

Gas Chromatography	
Intstrument	: HP-5890 Series II
Column	: HP-5(25 m×0.32 mm×0.22 μm)
Init. Temp.	: 100 ℃, 0 min.
Prog. Rate	: 10 ℃/min
Final Temp.	: 320 ℃
Inj. Temp	: 300 ℃
Flow rate	: 1 mL/min. He
Split Ratio	: 1/60
Mass Spectrometer	
Resolution	: 800
Ion current	: 300 μA
Ion voltage	: 70 V
Scan speed	: m/z 30-800
Chamber Temp.	: 0.5 ses.
Separator Temp.	: 270 ℃

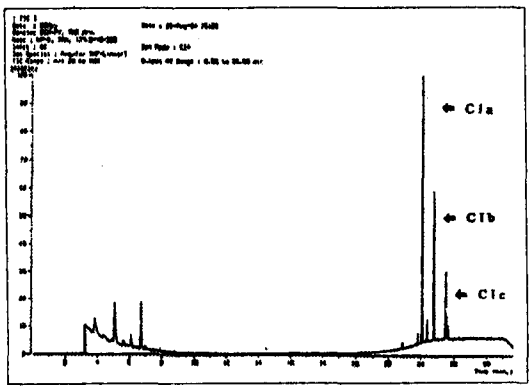


Fig. 2. GC-Mass Chromatogram of compound I.

들을 각각 CIa, CIb, CIc로 명명하였다. 이 혼합물의 mass data를 가지고 mass library spectrum과 비교 분석하였다.

CIa(*Fig*. 3)에서 M^+는 458이며 m/e 443은 M-CH_3를 보여주고 있다. m/e 368은 m/e 468-90으로 이것은 TMS($(CH_3)_3SiOH$)가 떨어져나간 fragment peak임을 보여주고 있다. M-129(m/e 341)와 m/e 129는 *Scheme* 1에서 보여주는 과정으로 얻어지는 fragment peak임을 보여주고 있다.[18]

CIb(*Fig*. 4)에서 M^+는 470이며 M-84(m/e 386)은 side chain의 allylic 위치가 끊어진 것을 알 수 있으며 M-129 와 m/e 129는 scheme 1과 같다 m/e 296은 *Fig*. 6과 같이 m/e 386에서 TMS가 끊어진 것임을 알

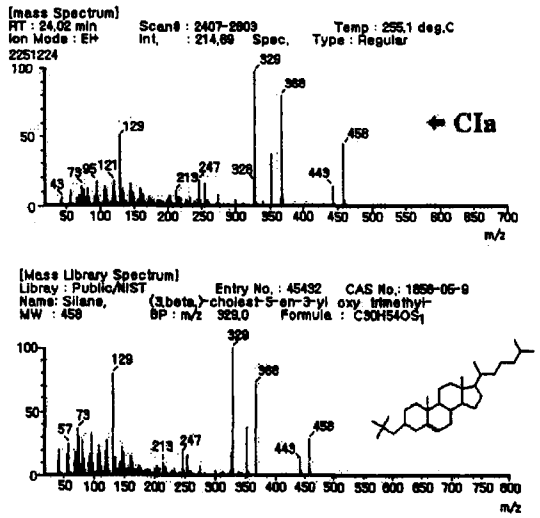


Fig. 3. Electron impact mass spectrum and library spectrum of C Ia.

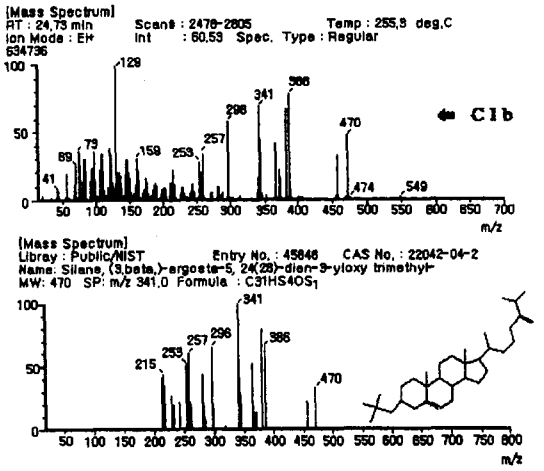


Fig. 4. Electron impact mass spectrum and library spectrum of CIb.

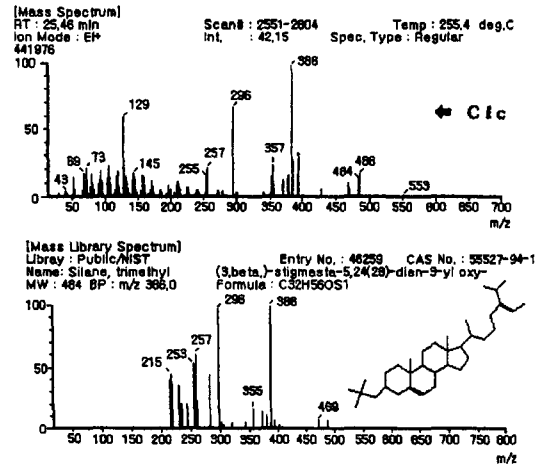


Fig. 5. Electron impact mass spectrum and library spectrum of CIc.

수 있다. M-217은 TMS와 side chain이 모두 끊어진 것으로 생각된다.[18,19,20]

CIc(*Fig.* 5)에서 M^+는 484이며 m/e 296은 m/e 386에서 TMS가 떨어진 것이며 m/e, 129는 *Scheme* 1과 같다.[18,19,20]

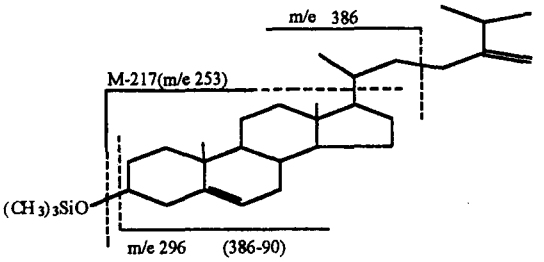


Fig. 6. Mass fragmentation of CIb.

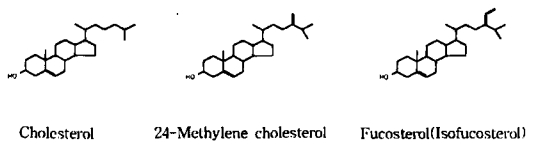
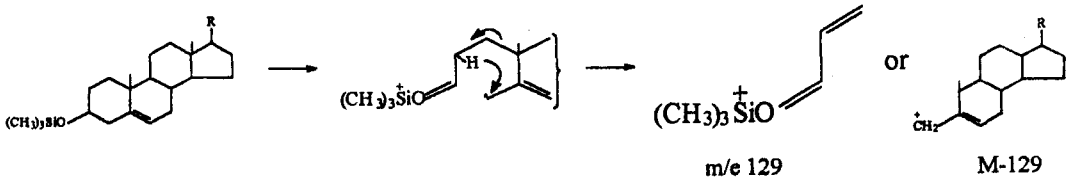


Fig. 7. Structures of compound I.

CI의 세개의 화합물은 기본적인 cholesterol 구조에서 C-24 위치에 이중결합과 메틸기가 하나 첨가되는 side chain이 다른 구조로서 끊어지는 유형에 일관성을 보여주고 있다.

GC-Mass에의한 mass library spectrum 비교 분석에 의해 CI의 3가지 화합물의 구조를 확인할 수 있었다(*Fig.* 7).

Goad[21]는 해양 무척추동물에 존재하는 sterol의 대사경로에 4가지 가능성을 제시하고 있다. 해양 sterol의 생합성경로는 직접 생합성, 공생미생물(미세조류, 세균, 곰팡이 등)로 인한 생합성, 섭취한 sterol의 대사(식이 sterol) 그리고 식이 sterol의 변화 등에 의해서 존재한다고 주장하였다. Fucosterol은 이미 와편모조인 *Amphidinium carterae*에서 free sterol로 분리가 확인되었다.[22] *Amphidinium*속은 해양 부영양화로 인한 적조 유발 미생물인 와편모조로 dinosterol등의 다양한 sterol을 생합성하여 생화학적 분류물질로 인식되고 있다. 이와같이 개불에서 확인된 sterol 화합물도 와편모조에서 출발한 먹이연쇄로 인한 식이 sterol에



Scheme 1.

서 생합성된 것으로 사려된다.

본 연구는 한국과학재단(95-0403-21-01-3) 및 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-96-3447)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Scheuer, P. J. *Bioorganic marine chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, 1987-1992; Vol. 1-6.
2. Kobayashi, J.; Ishibashi, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1753.
3. Shimizu, Y. J. *Nat. Prod.* **1985**, *48*, 223.
4. Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1897.
5. Kokke, W. C. M. C.; Fenical, W.; Djerassi, C. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 127.
6. Lee, R. H.; Papkoff, J. S.; Slate, D. L. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1591.
7. Murata, M.; Iwashita, T.; Yokoyama, A.; Sasaki, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6594.
8. Adachi, M.; Kakubari, M.; Ohizumi, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 774.
9. Adachi, M.; Fang, Y. I.; Kobayashi, J.; Yamakuni, T.; Ohizumi, Y. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 771.
10. Jones, L. R. *Biol. Chem.* **1980**, *255*, 9971.
11. Mackie, A. M.; Singh, H. T.; Fletcher, T. C. *Mar. Biol.* **1975**, *29*, 307.
12. Mackie, A. M.; Singh, H. T.; Owen, J. M. *Comp. Biochem. Physiol.* **1977**, *B56*, 9.
13. Hall, R.E.; Terwilliger, R. C.; Terwilliger, N. B. *Comp. Biochem. Physiol.* **1981**, *70B*, 353.
14. Garey, J. R.; Riggs, A. F. *Arch. Biochem. Biophy.* **1983**, *228*, 320.
15. 박영현.; 장성근. 순천향대학교논문집, **1991**, *14*, 885.
16. Tschesche, R. *J. Chromatog.* **1961**, *5*, 217.
17. Takeda, K.; Hara, S.; Wada, A.; Matsumoto, N. *J. Chromatog.* **1963**, *11*, 562.
18. Diekmann, J.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1005.
19. Wyllie, S. G.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 305.
20. Bergmann, J.; Lindgren, B. O.; Svalm, C. M. *Acta. Chem. Scand.* **1965**, *19*, 1661.
21. Goad, L. J. In *Marine Natural Products*; Scheuer, P. J., Ed.; Academic Press: New York, 1978; Vol. 2.
22. Kokke, W. C. M. C.; Fenical, W.; Djerassi, C. *Phytochemistry* **1980**, 20, 127.