

碩士學位論文

감태(*Ecklonia cava*)를 이용한
항산화물질의 분리 및 구조분석



濟州大學校 大學院

化學科

咸 瑛 旻

2005年 12月

감태(*Ecklonia cava*)를 이용한 항산화물질의 분리 및 구조분석

指導教授 李 南 昊

咸 瑛 旻

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2005年 12月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

咸瑛旻의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

2005年 12月

Separation and Structure Analysis of
Antioxidant Compounds from
Ecklonia cava

Young Min Ham

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
NATURAL SCIENCE
2005. 12.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 시약 및 기기	4
3. 실험방법	5
3-1 시료의 추출 및 유효성분 분리	5
3-1-1 감태의 메탄올 추출물 및 용매분획	5
3-1-2 Celite column chromatography에 의한 분리과정	5
3-1-3 Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분리 과정	5
3-1-4 화합물 3-8-4의 분리과정	6
3-1-5 Compound 1과 Triphlorethol-A의 Acetylation	8
3-2 항산화 활성 검색방법	9
3-2-1 DPPH 라디칼 소거활성	9
3-2-2 세포내 ROS 존재량 측정	9

III. 결 과	12
1. Phlorotannin의 구조 확인	12
2. Compound 1 및 Compound 1-a의 구조 확인	19
3. Phloroglucinol, Triphlorethol-A, Eckol의 항산화활성 결과	42
3-1 DPPH 라디칼 소거활성	42
3-1 세포 내 ROS 제거 활성	42
IV. 결 론	46
V. 참고문헌	47



List of Tables

Table 1. NMR data of Compound 1 and Triphlorethol- A	32
Table 2. NMR data of Compound 1-a and Triphlorethol- A-a	33
Table 3. Increment (ppm) for Acetylated Polyphenol	35
Table 4. Calculation ^{13}C NMR Chemical Shift (δ) of Compound 1-a	36



List of Figures

Figure 1. Chemical Structure of Phloroglucinol	3
Figure 2. Picture of <i>Ecklonia cava</i>	3
Figure 3. Isolation Procedure of <i>Ecklonia cava</i>	7
Figure 4. Acetylation of Compound 1	8
Figure 5. Mechanism of DCFH-DA Assay	11
Figure 6. ¹ H-NMR Spectrum of Diethylether Fraction	14
Figure 7. ¹ H-NMR Spectrum of Phloroglucinol	15
Figure 8. ¹ H-NMR Spectrum of Phlorotannin A	16
Figure 9. ¹ H-NMR Spectrum of Eckol	17
Figure 10. ¹ H-NMR Spectrum of Triphlorethol- A	18
Figure 11. ¹ H-NMR Spectrum of Compound 1	20
Figure 12. ¹ H-NMR Spectrum of Compound 1 with Coupling Constants	21
Figure 13. ¹³ C-NMR Spectrum of Compound 1	22
Figure 14. ¹ H-NMR Spectrum of Compound 1-a	24
Figure 15. ¹ H-NMR Spectrum of Compound 1-a Methyl Groups	25
Figure 16. ¹³ C-NMR Spectrum of Compound 1-a	26
Figure 17. HMQC-NMR Spectrum of Compound 1-a	27
Figure 18. HMBC-NMR Spectrum of Compound 1-a	28
Figure 19. HMBC Correlation of Compound 1-a	29
Figure 20. ¹ H-NMR Spectrum of Triphlorethol- A-a	30
Figure 21. ¹³ C-NMR Spectrum of Triphlorethol- A-a	31
Figure 22. FAB MASS Spectrum of Compound 1	37

Figure 23. Chemical Structure of Separated Phlorotannins from <i>Ecklonia cava</i>	39
Figure 24. Name of Phlorotannin Monomer and Dimer	40
Figure 25. Name of Fucodiphlorethols	41
Figure 26. DPPH Radical Scavenging Effect of Phloroglucinol	43
Figure 27. DPPH Radical Scavenging Effect of Eckol	43
Figure 28. DPPH Radical Scavenging Effect of Triphlorethol-A	44
Figure 29. Intracellular ROS Scavenging Effect of Phloroglucinol	44
Figure 30. Intracellular ROS Scavenging Effect of Eckol	45
Figure 31. Intracellular ROS Scavenging Effect of Triphlorethol-A	45

ABSTRACT

Ecklonia cava, an alga belonging to Alariaceae (Phaeophyta), is widely distributed at ~5m depth in the coast of Jeju island. *Ecklonia* species have been known to contain phlorotannins showing antioxidative activities. In this study, we described the chemical isolation and biological properties of antioxidative phlorotannins using *E. cava* collected in Jeju island.

Dried *E. cava* was extracted with 80% methanol, and the crude extract was partitioned into ethyl acetate and water. The ethyl acetate fraction was applied to celite column chromatography (CC), followed by sephadex LH-20 CC to give 11 fractions. Each fraction was analyzed by NMR spectroscopy to prove known phlorotannins such as phloroglucinol, triphlorethol-A and eckol as pure compounds.

Additional purification of the other fraction by prep-HPLC provided a new phlorotannin, which was tentatively named as fucodiphlorethol-**E**. The chemical structure of new compound was identified using 1D (^1H , ^{13}C NMR) and 2D (HMQC, HMBC) NMR method as well as FAB Mass spectrum.

Phloroglucinol, triphlorethol-A and eckol exhibited strong antioxidative activities using the study of DPPH radical scavenging test and intracellular ROS scavenging test (DCF-DA method).

I. 서 론

활성산소는 신체 노화를 비롯한 각종 성인병과 암의 주요 원인이다. 환경오염, 자외선, 화학적 자극 등에 의해 발생하는 활성 산소는 반응성이 매우 강한 산소종을 의미하여 대표적인 활성산소에는 singlet oxygen, superoxide radical, hydroxy radical, hydrogen peroxide 등이 있다. 이러한 활성산소들은 체내에서 살균 작용이나 이물질을 제거하는 기능을 담당하지만 너무 과도하게 생성 될 경우 신체를 공격하여 손상을 준다. 활성산소는 세포 DNA를 공격하여 DNA를 손상시켜 세포돌연변이, 즉 암을 유발하며 불포화지방을 산화시키고 결과적으로 이들이 혈관에 축적되어 동맥경화 같은 혈관질환을 발생하게 한다.

체내에서는 이러한 활성산소를 제거하기 위해 SOD, glutathione peroxidase, catalase 같은 효소들을 생성한다. 그러나 활성산소와 이들을 제거하는 효소들 간의 균형이 깨질 경우 외부로부터 항산화제의 공급이 필요하게 된다. 현재 널리 사용되고 있는 항산화제로는 ascorbic acid나 tocopherol 같은 비타민류와 녹차로부터 분리된 quercetin, EGCG 등이 있다. 이와 같이 세계적으로 부작용이 적은 천연물에서 보다 안정하고 강력한 항산화제를 확보하기 위해 노력하는 추세이지만 육상식물은 이에 대한 연구가 다양한 방면으로 연구되었으며 많은 결과가 집적되어 있다. 따라서 육상 식물이 아닌 생물종에 관심이 모아지고 있다.

지구상 생물 중 80%이상이 해양에 서식하고 있으며 해양 생물은 육상생물과 다른 대사 작용을 하므로 독특한 구조의 생리활성 물질들을 가지고 있다. 그러나 해양 천연물에 대한 연구는 불과 40년 미만의 역사를 가지고 있어 앞

으로 발전 가능성이 기대되는 분야이다.¹

Polyphenol은 육상, 해양식물의 2차 대사물이다. 육상과 해양의 polyphenol은 근본적으로 다른 화학구조를 가지고 있다. 육상식물의 polyphenol은 flavonoid나 gallic acid를 기본으로 하는 중합체이지만 해양식물의 polyphenol은 poly hydroxylated phenol 인 phlorotannin이며 phloroglucinol(Figure 1) 간의 aryl-aryl, aryl-ether결합으로 이루어진 중합체이다.² 육상 식물의 polyphenol의 생리 활성은 항산화활성, 항알러지활성, 항종양성 등 많은 연구가 진행되었으나 이에 비해 해조류의 phlorotannin에 대한 연구는 아직 미비하다고 할 수 있다. Phlorotannin에 대한 연구는 *Eisenia bicyclis*의 glycosidase 저해활성³을 비롯하여 항산화활성,^{4,5} hyaluronidase 저해활성,⁶ 항균성,⁷ 항플라즈민저해활성⁸ 등이 있으며 현재 계속하여 다양한 기능성 연구결과 보고되고 있다.^{9,10,11} Phlorotannin의 생리활성은 phloroglucinol의 중합정도에 따라 차이가 나며 이것은 hydroxyl기에 의한 단백질사이의 어떤 상호작용에 의한 것으로 보고 있다.

감태(*Ecklonia cava*)는 비식용 해조류로 갈조식물 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)의 식물로 주로 우리나라 남해안과 제주연안, 일본에 서식하고 있다(Figure 2). 길이는 1~2m 이며 줄기는 원기둥 모양이고 밑동은 뿌리 모양이다. 가운데 부분은 굵고 어릴 때는 속이 차 있으나 다 자란 뒤에는 속이 비기도 한다. 줄기 끝에는 결잎조각을 가진 납작한 1개의 가운데잎이 달린다. 이 잎은 길이 1m 정도이고 갈색이지만 말리면 검은빛이 된다. 주로 전복·소라 등의 먹이가 되며 알긴산이나 요오드·칼륨을 만드는 주요 원료로 사용되고 있다.

감태의 생리활성 물질은 phlorotannin이며 이들에 대한 생리활성은 HIV-1 역전사효소 저해활성,¹² xanthin oxidase 저해활성,¹³ tyrosinase 활성억제효과^{14,15}들이 연구 보고된 바 있다.

본 연구에서는 감태에서 phlorotannin을 컬럼크로마토그래피를 통하여 분리·동정하고 항산화활성을 살펴보았으며 신물질로 분리된 한 개의 phlorotannin에 대해 구조분석을 하였다.

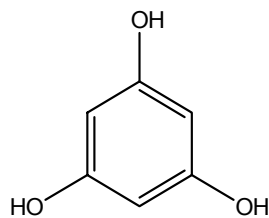


Figure 1. Chemical structure of phloroglucinol



Figure 2. Picture of *Ecklonia cava*

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 감태는 제주도 북제주군 애월읍 귀덕리 앞바다에서 채집하였고 실내에서 통풍건조한 후 분쇄기로 갈아 분말상태로 냉장보관 하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., Junsei Co.의 제품을 사용하였다. Celite column chromatography에는 celite(Celite 545, Celite Korea Ltd.)가 사용되었으며, sephadex column chromatography에는 Sephadex LH-20(25~100 μm)이 사용되었다. 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. Prep-LC(Preparation Liquid Chromatography)는 LC-9104(JAI KOREA)를 사용하였고 ODS-Column을 장착하여 분리하였다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. 분자량 측정에 이용되는 FAB Mass는 JMS-700(JEOL, 6 kV 10 mA)를 사용하고 gas는 argon을 사용하였다.

3. 실험방법

3-1 시료의 추출 및 유효성분 분리

3-1-1 감태의 메탄올 추출물 및 용매분획

감태 건조분말 4026.4 g을 80% MeOH 16 L에 침적하고 실온에서 24 시간동안 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통하여 여액을 취하여 감압농축 하였으며 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 3회 반복하였다. 이 과정을 통하여 80% 메탄올 추출물 1012.5 g을 얻었다. 80% 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔대기에서 ethyl acetate를 사용하여 용매분획을 하여 EtOAc층과 H₂O층을 얻었다 (Figure 3).



3-1-2 Celite column chromatography에 의한 분리과정

용매분획 하여 얻어진 EtOAc분획을 Celite를 충전한 glass column을 이용하여 분리하였다. 용출용매는 hexane, CH₂Cl₂, diethyl ether, MeOH을 사용하여 각각 4개의 분획을 얻을 수 있었다(Figure 3).

3-1-3 Sephadex LH-20 Column Chromatography에 의한 분리과정

3-1-2에서 얻어진 분획 중 diethyl ether 분획을 분리하기 위해 Sephadex LH-20을 충전한 Column을 이용하였다. 이동상으로는 CHCl₃/MeOH = 2/1, 1/1, 0/1을 사용하여 11개의 분획을 얻었다(Figure 3).

3-1-4 Compound 1의 분리과정

3-1-3에서 얻어진 11개의 분획 중 8번째 분획을 ODS column이 장착된 Prep-LC를 이용하여 분리하여 E-3-8-4(Compound 1)를 얻었다. 이동상은 MeOH을 사용하였다(Figure 3).



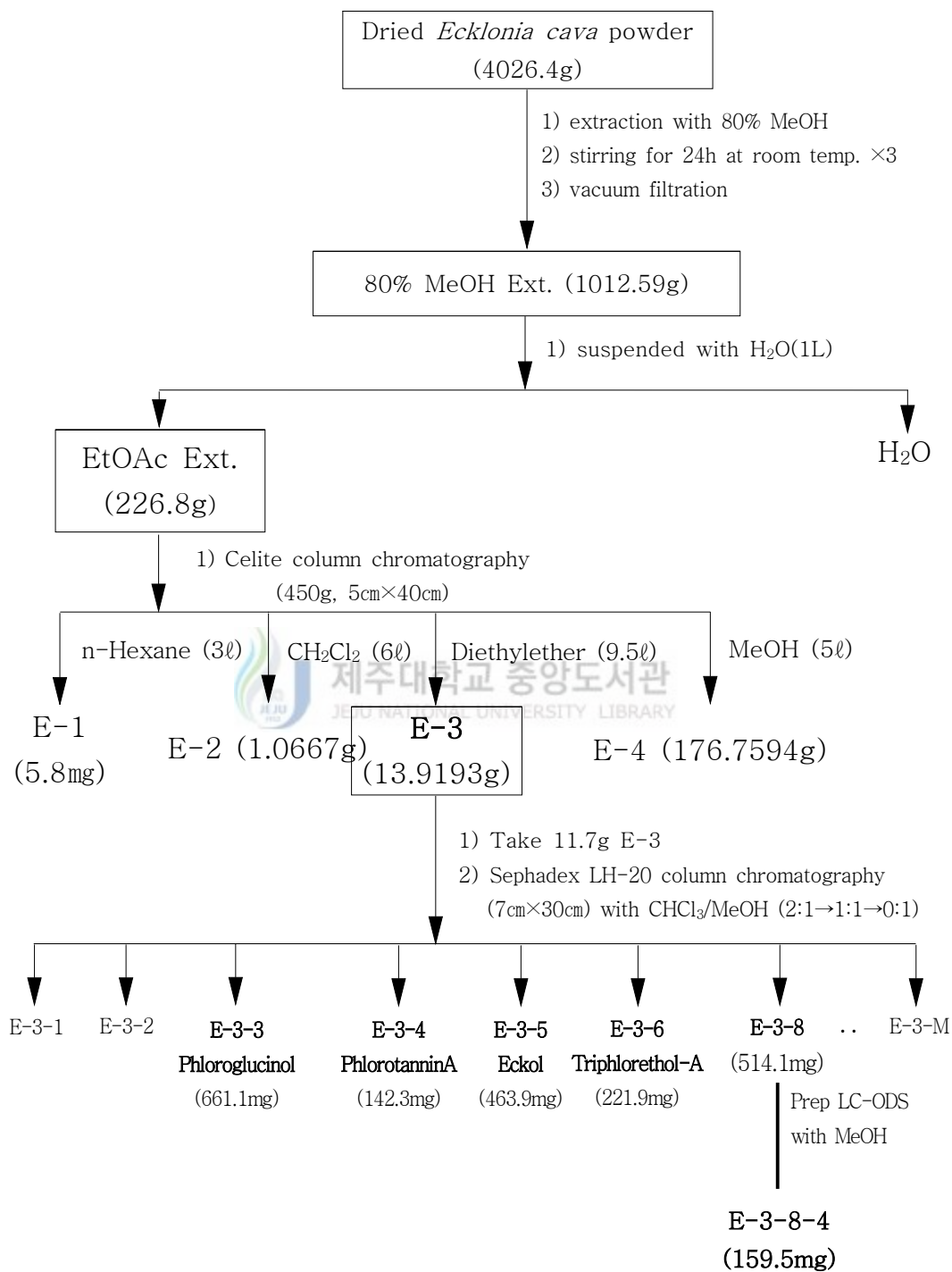


Figure 3. Isolation Procedure of Phlorotannins from *Ecklonia cava*

3-1-5 Compound 1 (E-3-8-4) 과 Triphlorethol-A의 Acetylation.

Compound 1의 정확한 구조를 확인하기 위해 compound 1 52 mg을 취하여 acetic anhydride 1 ml를 가하고 pyridine을 용매로 사용하여 아세틸화 시켜 compound 1-a(E-3-8-4-Ac, 7.1 mg)를 얻었다(Figure 4). Triphlorethol-A 또한 동일한 방법으로 아세틸화 시켰다.

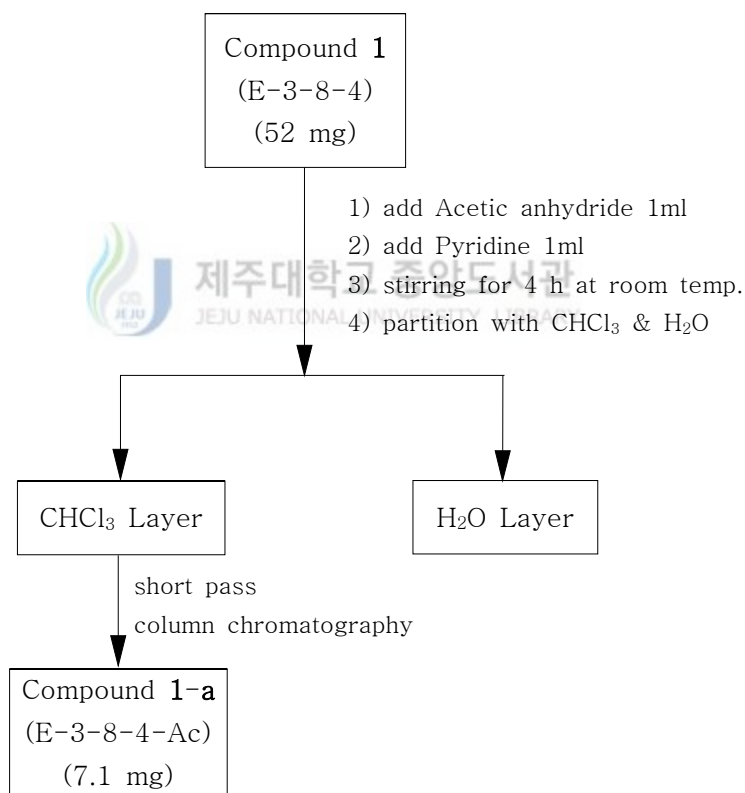


Figure 4. Acetylation of Compound 1

3-2 항산화 활성 검색방법

3-2-1 DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거 활성 실험은 Blois^{16,17}방법을 이용하였다. 메탄올에 희석시킨 다양한 농도의 시료 0.3 ml와 에탄올 0.2 ml을 혼합한 후 메탄올에 녹인 1×10^{-4} M DPPH 용액 2.5 ml를 가하여 최종 부피를 3 ml로 맞춘다. 5 시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거활성 능력은 다음과 같은 방법으로 구하였다.^{18,19,20}

$$\text{scavenging effect(\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

A_0 : 520 nm DPPH의 흡광도

A : 520 nm DPPH와 시료반응액의 흡광도

A_b : 520 nm 시료의 흡광도

각 시료의 IC₅₀수치를 구하고 이때 IC₅₀은 라디칼소거 활성 능력이 50%일 때의 시료의 농도를 의미한다.

3-2-2 세포 내 ROS 존재량 측정

세포 내 존재하는 ROS의 양을 측정하기 위해 DCFH-DA 방법을 사용하였다.²¹

2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 세포에 유입되면 세포 내 esterase에 의해 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(DCFH)으로 가수 분해되고 세포 내에 산화제가 존재하면 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산

화되어 형광을 띠게 된다(Figure 5). 따라서 세포 내 ROS의 양에 따라 DCF의 생성양이 결정되므로 ROS양을 측정 할 수 있다.

V79-4세포를 96 well plate에 1×10^5 cell/ml 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 6시간동안 배양 후 여러 농도의 시료용액을 첨가하고 30분 후 1 mM H₂O₂를 가하여 30분 동안 37°C에서 반응시켰다. 30 분 후 25μM DCFH-DA 용액을 가한 후 spectrofluorometer로 DCF의 형광정도를 측정하였다. DCF의 흡수파장은 485 nm이고 방출파장은 535 nm이다. 이 때 DCF의 방출에너지를 측정하여 각 물질의 세포 내 ROS 제거능력을 확인하였다.



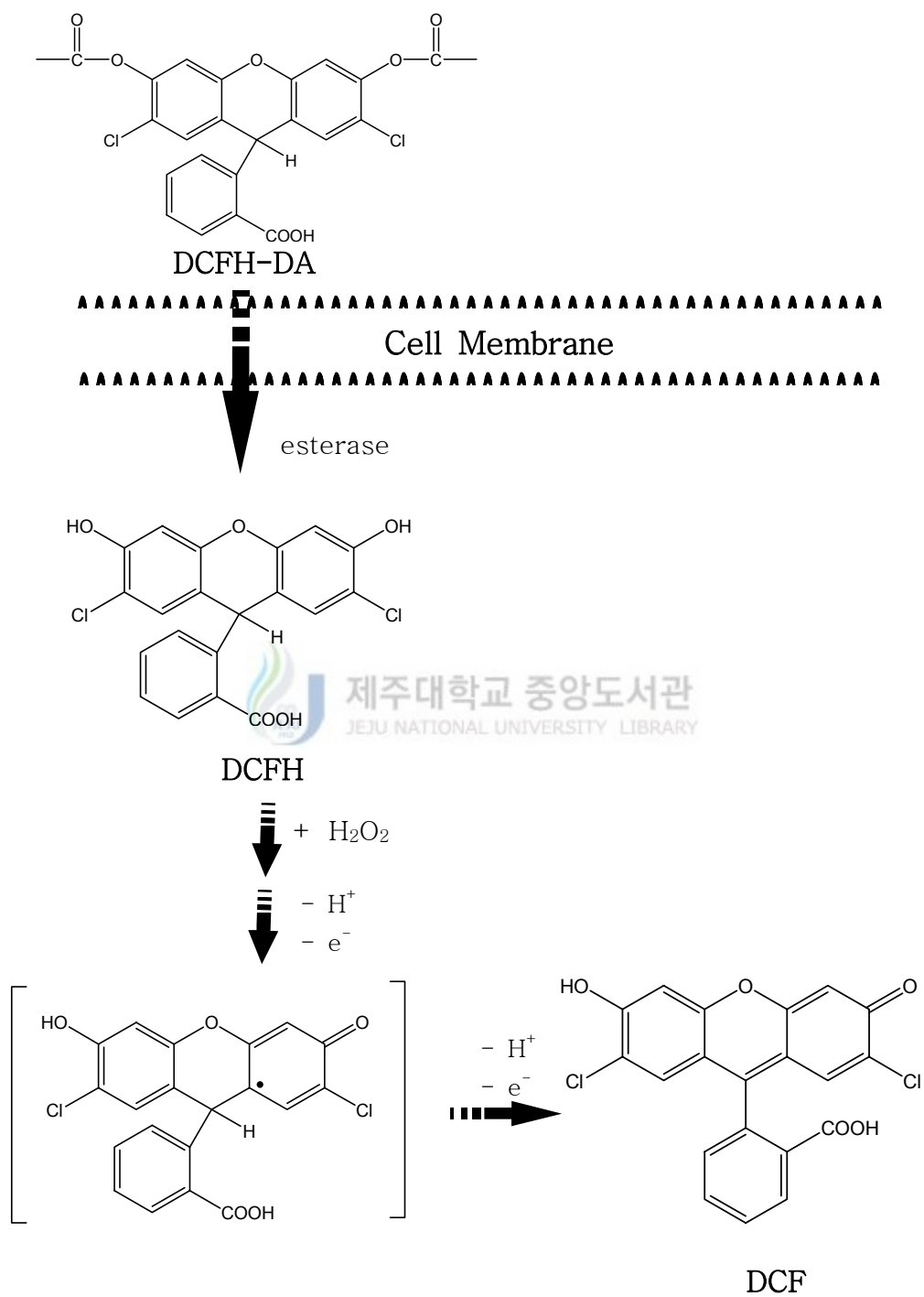


Figure 5. Mechanism of DCFH-DA Assay

III. 결 과

1. Phlorotannin의 구조 확인

감태 건조분말(4026.4g)을 80% MeOH로 추출한 후 EtOAc와 H₂O로 용매 분획하고 얻어진 EtOAc 분획으로 Hexane, CH₂Cl₂, diethyl ether, MeOH을 사용하여 celite column chromatography로 분리하여 각각 4개의 분획을 얻었다. 얻어진 각 분획들의 phlorotannin 포함 여부를 NMR 기기를 통하여 확인하였다.

이 중 phlorotannin을 가장 많이 포함하고 있는 diethyl ether 분획 (Figure 6)으로 전개용매 (CHCl₃/MeOH = 2/1 to 1/1 to 0/1)를 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography로 11개의 분획을 얻었다. 각 분획들을 먼저 TLC(전개용매 : CHCl₃/MeOH = 2/1)로 확인 후 NMR기기를 통하여 다시 확인 하여 4개의 화합물을 얻을 수 있었다.

E-3-3 분획은 ¹H NMR 결과 5.7 ppm에서 singlet으로 나타나는 것으로 보아 aromatic ring이 있음을 알 수 있었고 문헌²²과 비교해 본 결과 phloroglucinol임을 확인하였다(Figure 7).

E-3-4 분획은 ¹H NMR결과 5.95(*d*, *J* = 2.0), 5.98(*d*, *J* = 2.0), 6.00(*d*, *J* = 2.0), 6.02(*d*, *J* = 2.0), 6.13(*s*) ppm에서 피크를 확인하였고 문헌²²과 비교한 결과 phlorotannin A가 있음을 확인하였으며 약간의 불순물이 포함되어 있어 정제가 필요할 것으로 여겨진다(Figure 8).

E-3-5분획은 ¹H NMR결과 5.93(*s*), 5.93(*s*), 6.13(*s*) ppm 에서 피크를 확인하였고 문헌²과 비교한 결과 eckol임을 확인하였다(Figure 9).

E-3-6분획은 ^1H NMR결과 5.7(*d*, $J = 2.7$), 5.8(*s*), 5.9(*t*, $J = 2.2$), 6.0(*d*, $J = 2.2$), 6.0(*d*, $J = 2.2$) ppm에서 피크를 확인하였고 문헌²³과 비교한 결과 triphlorethol-A임을 확인하였다(Figure 10).

각 분획 중 양이 많고 비교적 ^1H NMR결과가 비교적 깨끗했던 E-3-8 분획을 ODS가 장착된 Prep LC(이동상 : MeOH)를 통하여 compound 1(E-3-8-4)으로 분리하였다.



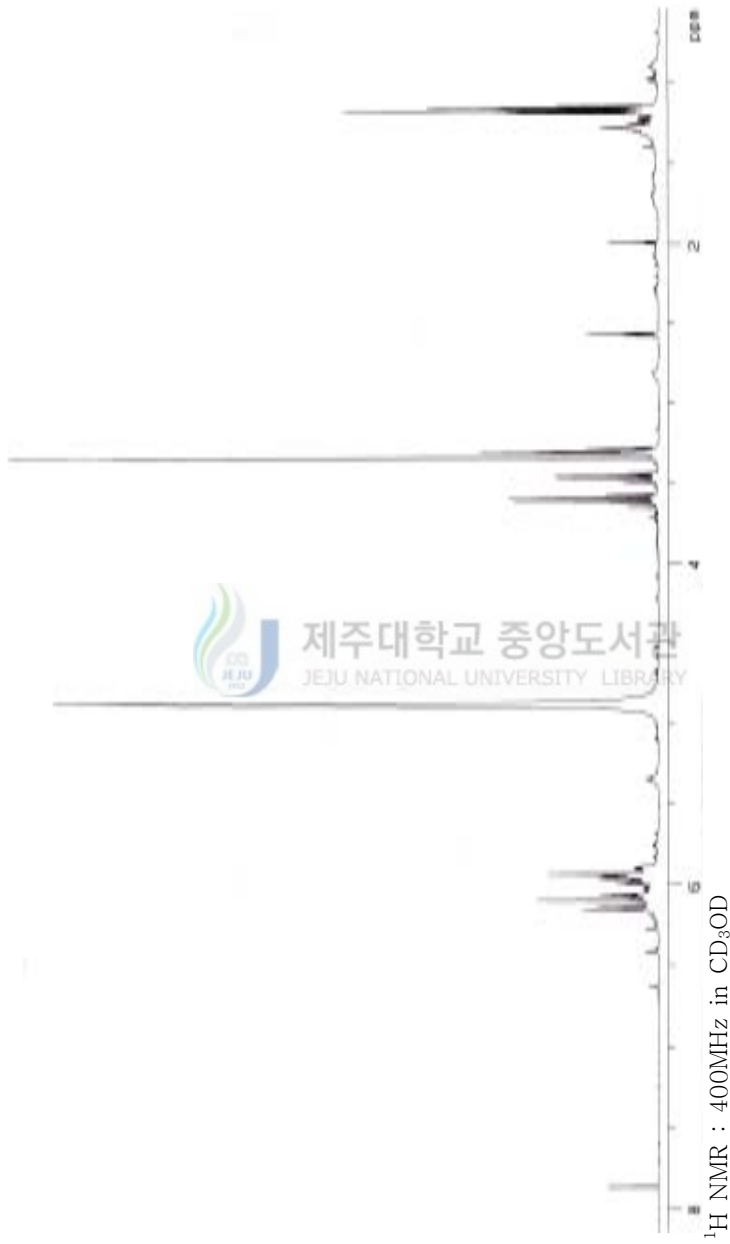


Figure 6. ^1H -NMR Spectrum of Diethyl ether Fraction

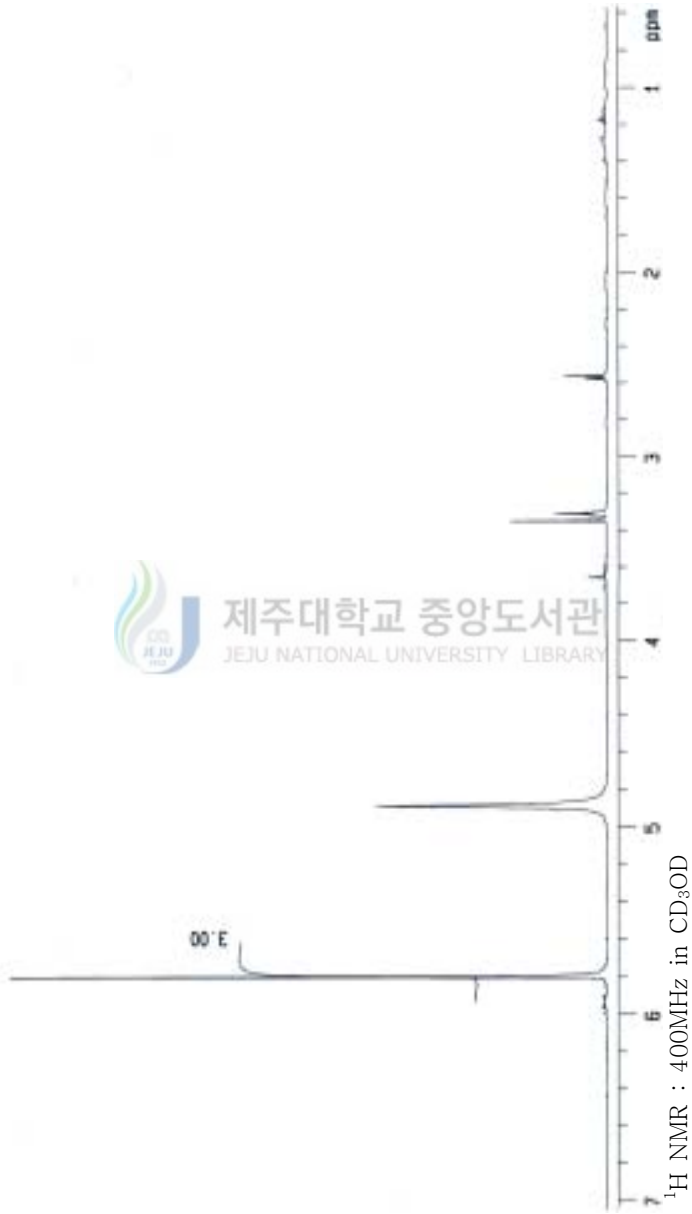


Figure 7. ^1H -NMR Spectrum of Phloroglucinol

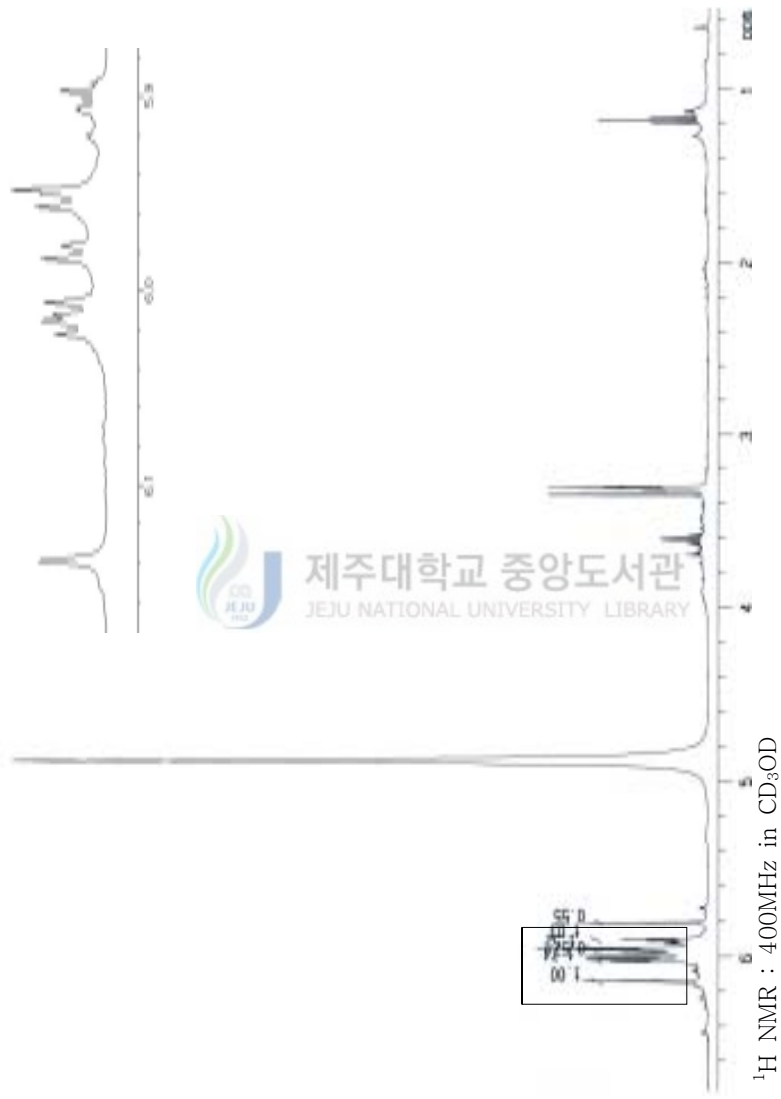


Figure 8. ^1H -NMR Spectrum of Phlorotannin A

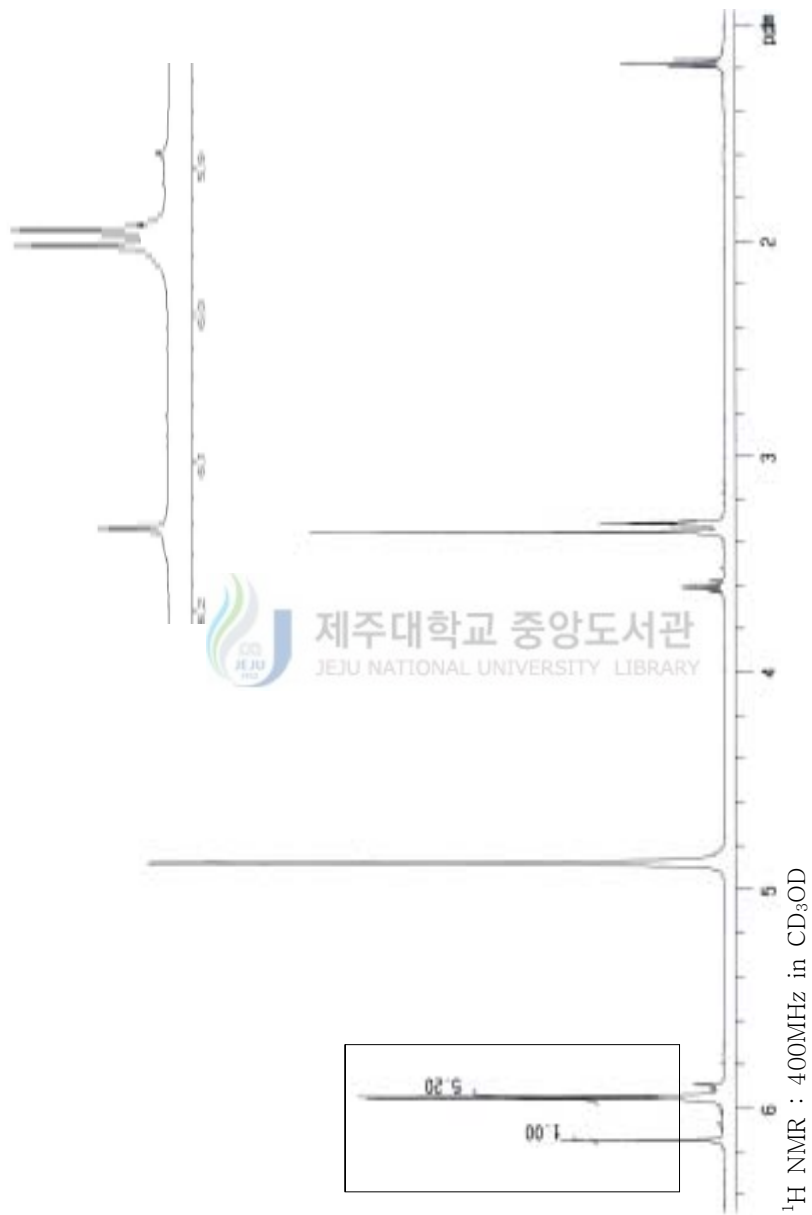


Figure 9. ¹H-NMR Spectrum of Eckol

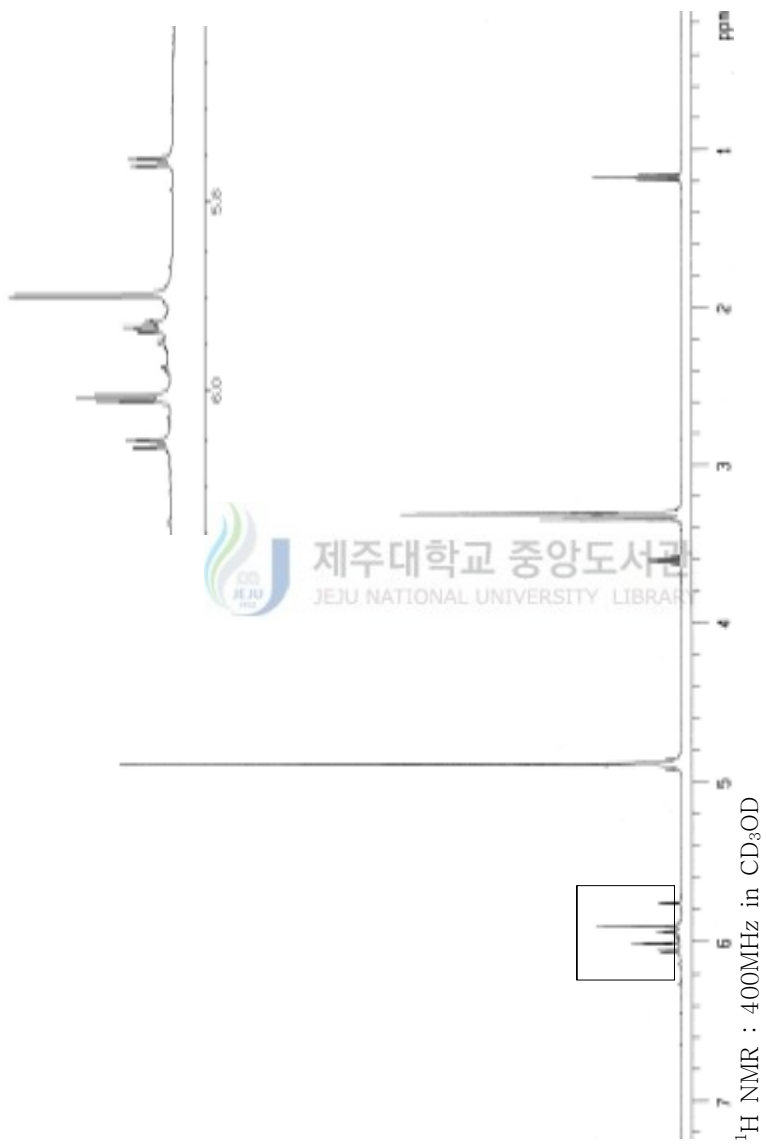


Figure 10. ^1H -NMR Spectrum of Triphlorethol-A

2. Compound 1 (E-3-8-4) 및 Compound 1-a (E-3-8-4-Ac) 의 구조 확인

Compound 1의 구조 확인은 ^1H NMR, ^{13}C NMR, FAB MASS를 통하여 확인하였다.

^1H NMR을 통하여 확인 한 결과 δ 6.1(*d*, $J = 2.2$), 6.05(*s*), 6.03(*d*, $J = 2.2$), 6.02(*d*, $J = 2.68$), 5.91(*s*), 5.69(*d*, $J = 2.68$)의 signal로 보아 벤젠고리가 있음을 확인하였고 coupling constant를 통해 서로 *meta* 위치 coupling 하고 있음을 알 수 있었다.(Figure 11, 12).

^{13}C NMR을 통하여 확인 한 결과 탄소의 총 개수가 24개 이상임을 예상하였다.(Figure 13)

또한 감태에서 이미 분리된 triphlorethol-A의 NMR data와 비교했을 때 ^1H NMR spectrum에서 수소 피크 하나가 차이 났으며 ^{13}C NMR spectrum 에서는 탄소 수는 6개가 차이 났다(Table 1). 따라서 compound 1은 triphlorethol-A에 phloroglucinol 단위 하나가 더 연결되었다고 추측하였다.

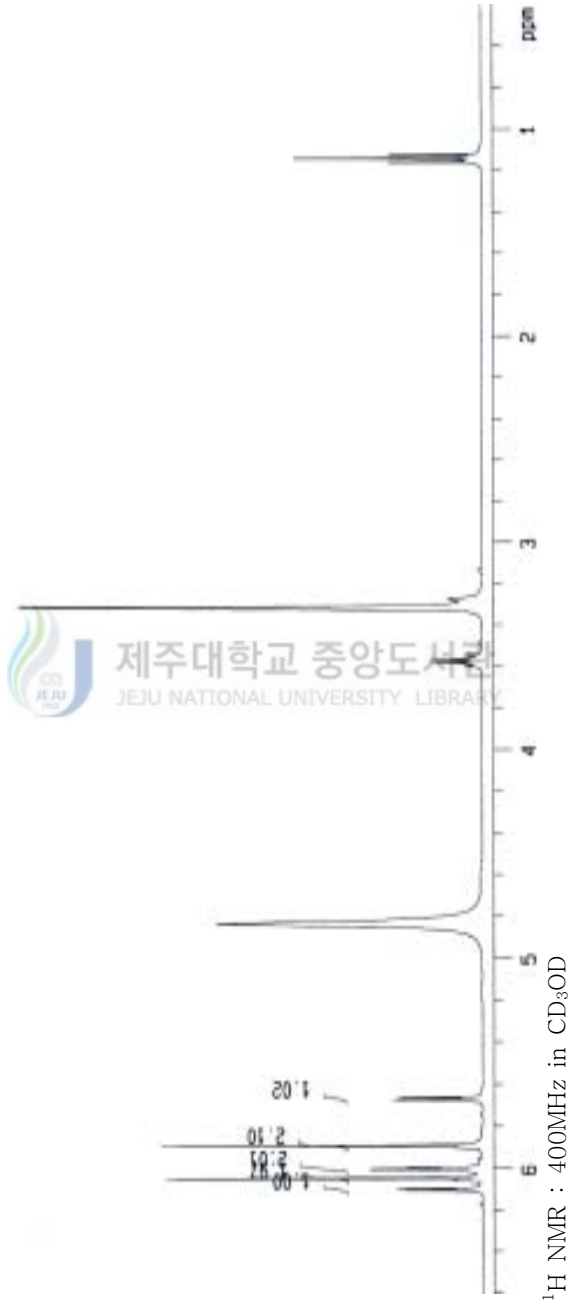


Figure 11. ^1H -NMR Spectrum of Compound 1

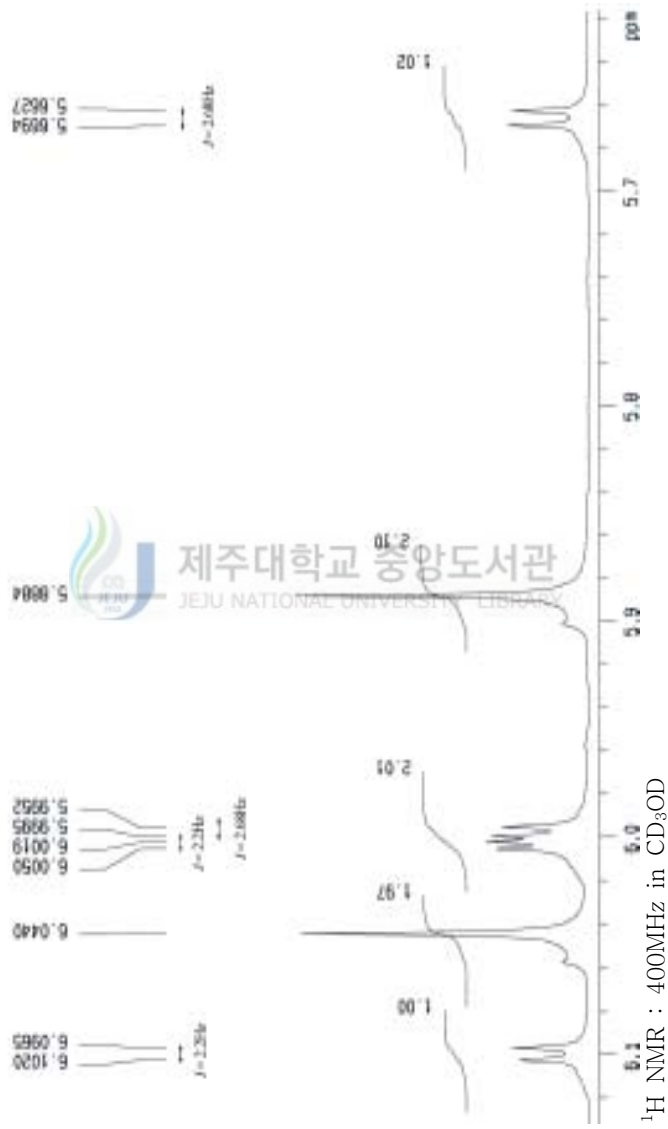


Figure 12. ^1H -NMR Spectrum of Compound 1 with Coupling Constant

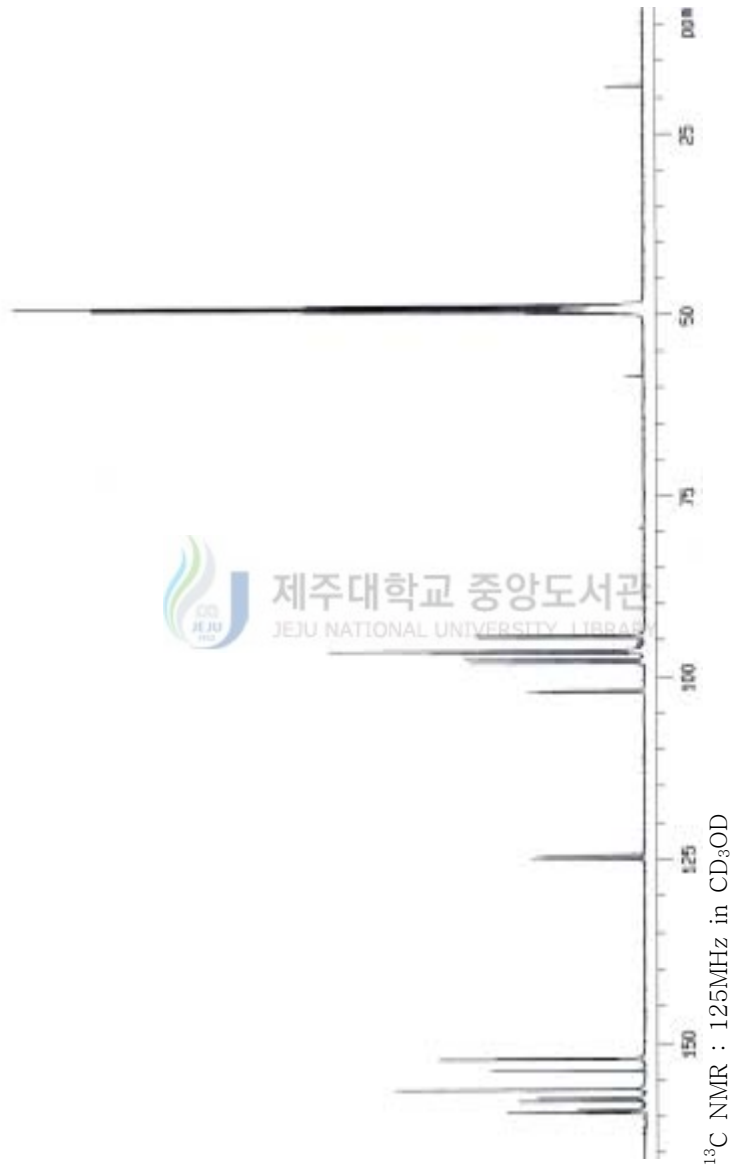


Figure 13. ^{13}C -NMR Spectrum of Compound 1

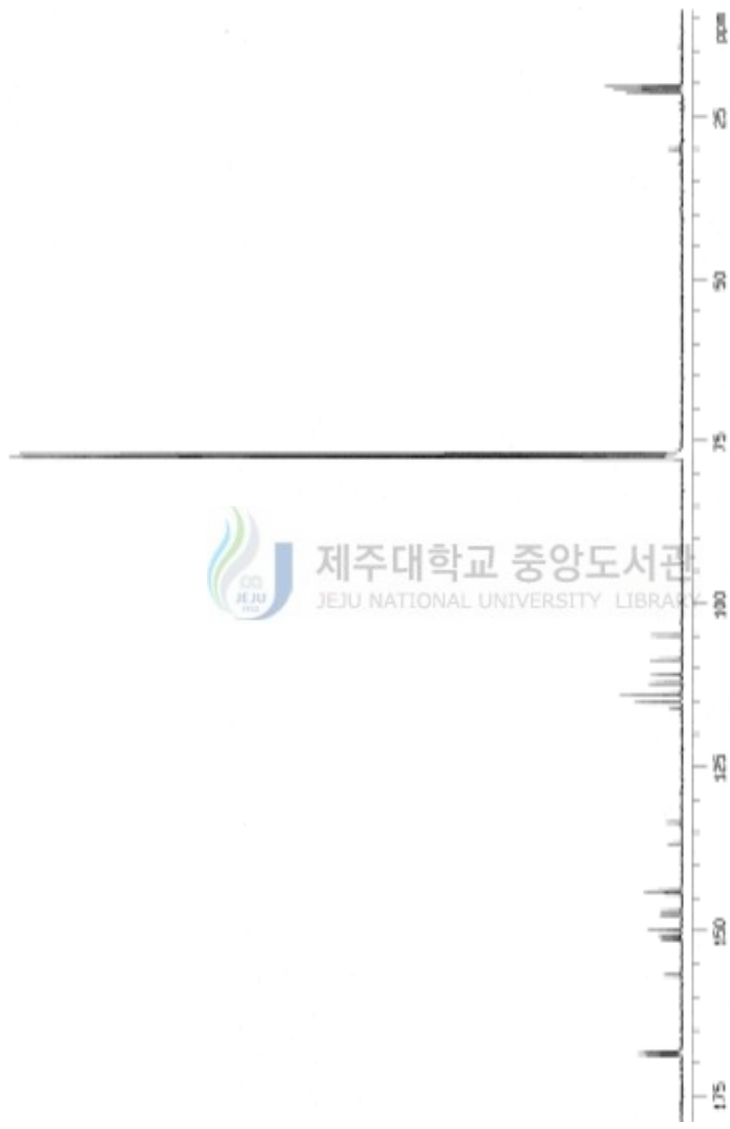
또한 compound 1의 정확한 hydroxy기의 개수를 알기위해 아세틸화시킨 후 다시 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMBC, HMQC을 통하여 구조를 확인하였다. hydroxy기가 아세틸기로 치환되어 얻어진 ^1H NMR spectrum에서 적분값을 통하여 10개의 methyl 그룹을 확인하였고 또한 ^{13}C NMR spectrum에서도 10개의 methyl 그룹을 확인하였다(Figure 14, 15, 16). HMQC를 통하여 탄소와 수소의 상호관계를 확인하였으며 HMBC로 구조를 결정하였다(Figure 17, 18).

HMQC NMR spectrum에서 8개의 수소 피크가 각 예상탄소와 매우 정확히 교차함을 확인하였다. HMBC NMR spectrum에서 통해 4개의 각 aromatic ring에 있는 사차 탄소와 2개의 수소간의 피크가 교차하는 것으로 보아 수소가 2개씩 존재함을 확인하였다(Figure 19). 산소로 연결되어 있는 aromatic ring 사이에서는 long lunge coupling을 확인 할 수 없었으나 aryl형태로 연결되어 있는 aromatic ring에서 2'', 6'' 탄소와 6''수소간의 long lunge coupling을 확인하여 두 aromatic ring이 서로 연결되어 있음을 확인하였다.



^1H NMR : 400MHz in CDCl_3

Figure 14. ^1H -NMR Spectrum of Compound 1-a



^{13}C NMR : 100MHz in CDCl_3

Figure 16. ^{13}C -NMR Spectrum of Compound 1-a

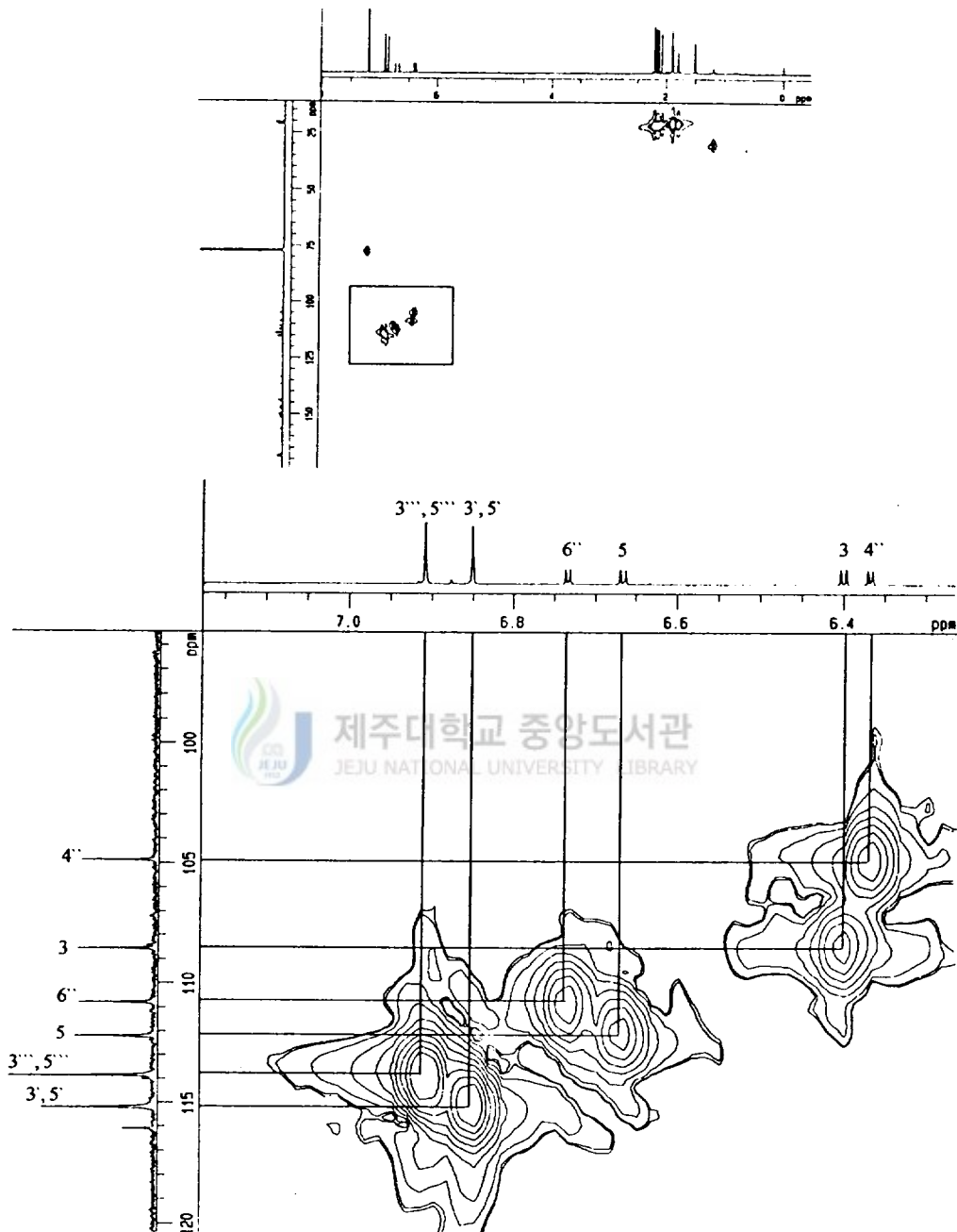


Figure 17. HMQC NMR Spectrum of Compound 1-a

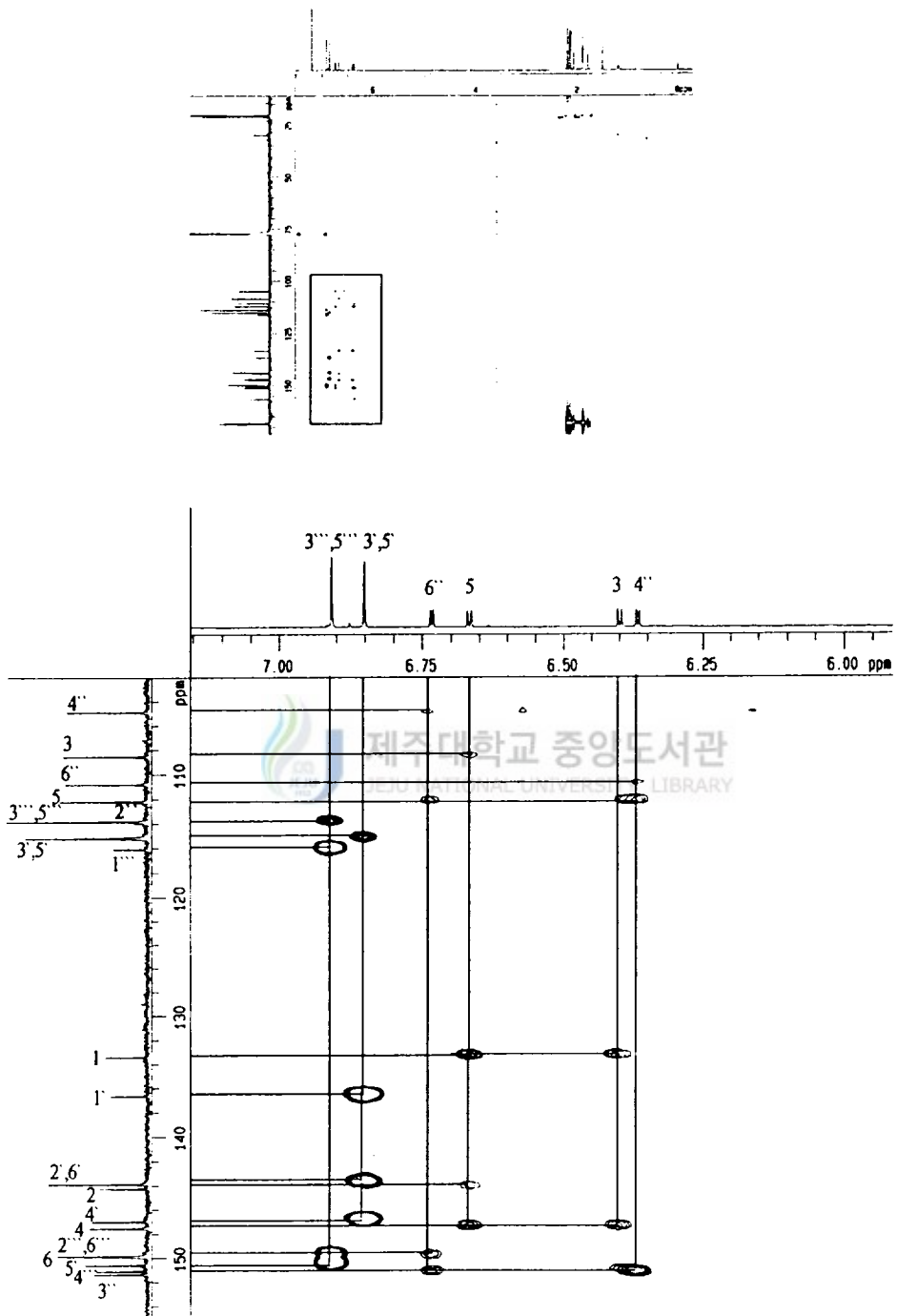


Figure 18. HMBC NMR Spectrum of Compound 1-a

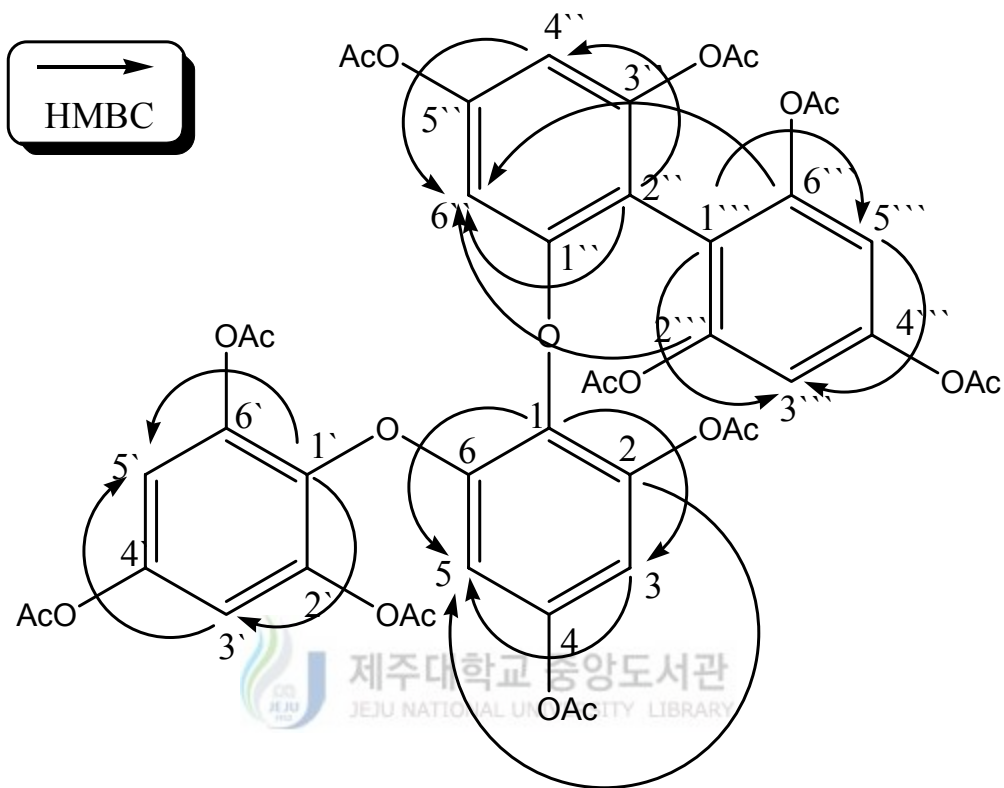


Figure 19. HMBC Correlation of Compound 1-a

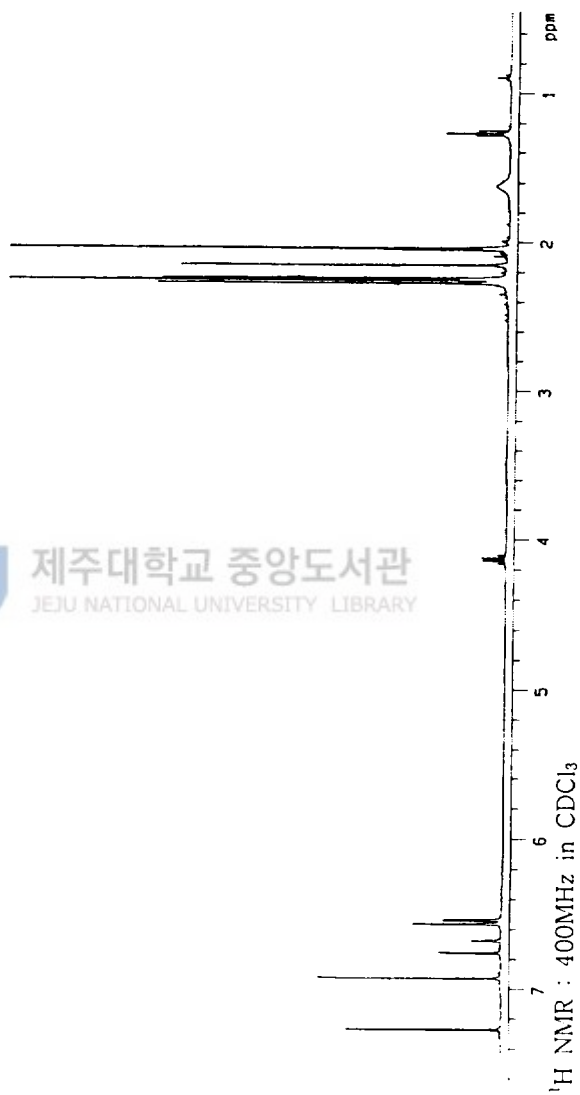
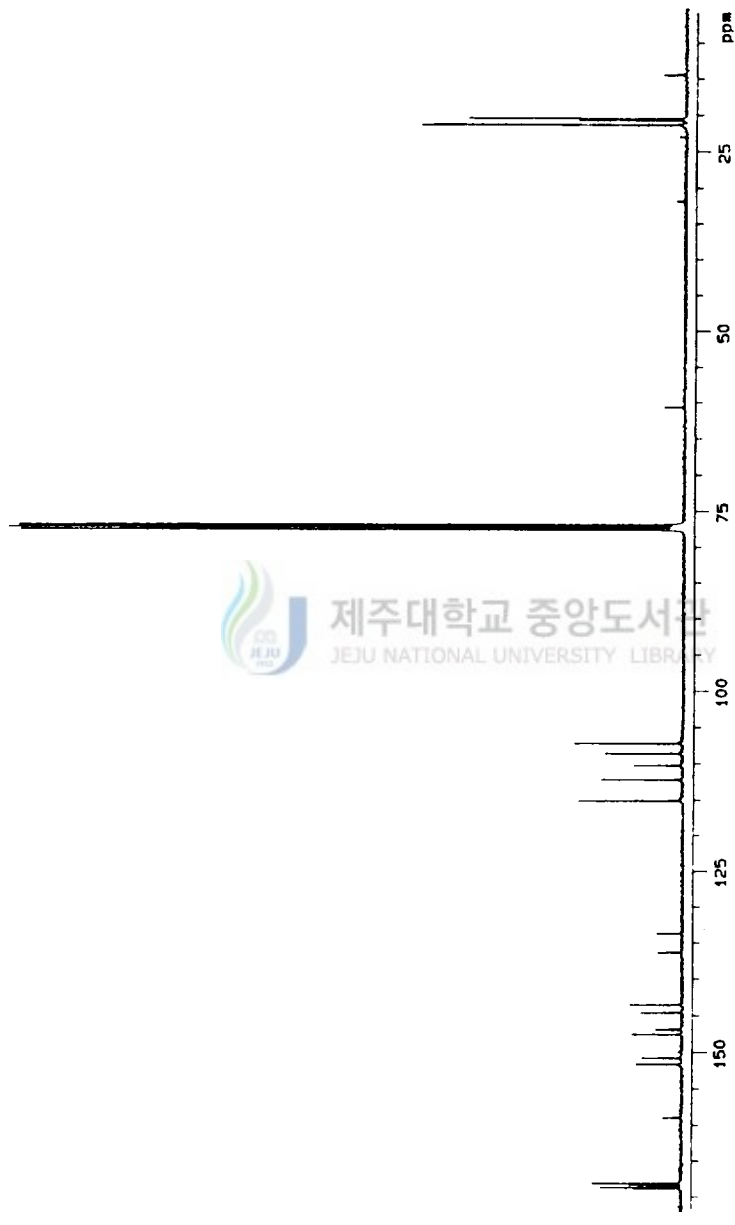


Figure 20. ^1H -NMR Spectrum of Triphlorethol-A-a




 제주대학교 중앙도서관
 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 21. ^{13}C -NMR Spectrum of Triphlorethol-A-a

Table 1. NMR Data of Compound **1** and Triphlorethol-A

position	Compound 1		Triphlorethol-A	
	δ_C	δ_H (multi, <i>J</i> Hz)	δ_C	δ_H (multi, <i>J</i> Hz)
1	124.9		125.7	
2	157.5		152.7	
3	98.0	5.6(<i>d</i> , 2.68)	98.0	5.7(<i>d</i> , 2.7)
4	153.7		156.1	
5	94.5	6.0(<i>d</i> , 2.68)	94.9	6.0(<i>d</i> , 2.9)
6	152.0		153.7	
1'	124.3		124.6	
2'	152.1		152.1	
3'	96.0	5.9(<i>s</i>)	96.2	5.8(<i>s</i>)
4'	157.9		156.4	
5'	96.0	5.9(<i>s</i>)	96.2	5.8(<i>s</i>)
6'	152.1		152.1	
1''	159.4		162.4	
2''	102.0		95.4	6.0(<i>d</i> , 2.2)
3''	159.2		160.3	
4''	97.5	6.1(<i>d</i> , 2.2)	97.5	5.9(<i>t</i> , 2.2)
5''	159.5		160.3	
6''	94.3	6.0(<i>d</i> , 2.2)	95.4	6.0(<i>d</i> , 2.2)
1'''	101.8			
2'''	156.3			
3'''	96.4	6.05(<i>s</i>)		
4'''	159.2			
5'''	96.7	6.05(<i>s</i>)		
6'''	156.3			

$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD

Table 2. NMR Data of Compound **1-a** and Triphlorethol-**A-a**

Position	Compound 1-a			Triphlorethol- A-a	
	δ_C	δ_H (multi, <i>J</i> Hz)	HMBC	δ_C	δ_H (multi, <i>J</i> Hz)
1	133.4		3, 5	133.6	
2	144.2		5	144.5	
3	108.5	6.4(<i>d</i> , 2.6)	5	112.1	6.7(<i>d</i> , 2.7)
4	147.5			147.5	
5	112.1	6.6(<i>d</i> , 2.6)	3	108.5	6.5(<i>d</i> , 2.7)
6	149.9			150.8	
1'	136.6		3', 5'	136.2	
2'	143.8			143.5	
3'	115.1	6.8(<i>s</i>)	5'	115.0	6.9(<i>s</i>)
4'	146.9			146.8	
5'	115.1	6.8(<i>s</i>)	3'	115.0	6.9(<i>s</i>)
6'	143.8			143.5	
1''	156.6			158.9	
2''	112.2		4'', 6''	107.1	6.56(<i>d</i> , 1.9)
3''	151.3			151.6	
4''	104.8	6.3(<i>d</i> , 2.2)	6''	110.2	6.6(<i>t</i>)
5''	150.5			151.6	
6''	110.7	6.7(<i>d</i> , 2.2)	4''	107.1	6.56(<i>d</i> , 1.9)
1'''	116.0		3''', 5'''		
2'''	149.8		6''		
3'''	113.8	6.9(<i>s</i>)	5'''		
4'''	151.0				
5'''	113.8	6.9(<i>s</i>)	3'''		
6'''	149.8		6''		

$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CDCl_3 , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CDCl_3

또한 compound 1-a의 ^{13}C data를 이용하여 compound 1의 구조를 증명할 수 있었다.

1985년 S. Wegner 등은 아세틸화 된 polyphenol의 ^{13}C NMR data와 하나의 aromatic ring 치환기에 따른 기존의 additive rule에 의한 계산값이 항상 다르게 나옴을 알게 되었다. 따라서 polyphenol같이 다수의 aromatic ring이 결합한 구조에서는 ^{13}C chemical shift값이 공간적 영향에 의해 이동한다고 생각하였다. 아세틸화된 다양한 polyphenol의 ^{13}C NMR을 측정하고 실험값에 가장 근접하게 하는 여러 항(increments)들을 결정하게 되었다. 즉 아세틸화된 polyphenol은 각 항들(Table 3)의 계산에 의해 치환기 위치 및 종류를 예상 할 수 있게 되었다.²³ 따라서 compound 1-a 각 탄소의 공간적 위치, 즉 acetoxy와 phenoxy의 위치에 따라 탄소의 ^{13}C chemical shift가 달라지는 결과를 계산값과 실험값을 비교하여 compound 1의 구조를 증명 할 수 있었다(Table 4).

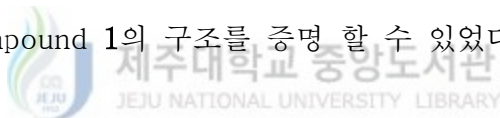


Table 3. Increment (ppm) for Acetylated Polyphenol

BI	Acetoxy				Phenoxy				Steric		
	IA	OA	MA	PA	IP	OP	MP	PP	POA	SO	SO1
128.0	21.9	-6.1	0.7	-3.0	28.8	-7.7	1.0	-5.1	-3.9	-1.2	-2.4

BI = Base increment 128.0 ppm

IA = Influence of acetoxy substitution at C-1 on C-1 (ipso).

OA = Influence of acetoxy substitution at C-2 on C-1 (ortho).

MA = Influence of acetoxy substitution at C-3 on C-1 (meta).

PA = Influence of acetoxy substitution at C-4 on C-1 (para).

IP = Influence of phenoxy substitution at C-1 on C-1 (ipso).

OP = Influence of acetoxy substitution at C-2 on C-1 (ortho).

MP = Influence of acetoxy substitution at C-3 on C-1 (meta).

PP = Influence of acetoxy substitution at C-4 on C-1 (para).

POA = Influence of 2,6-diacetoxyphenoxy substitution at C-2 on C-1.

SO = Influence of acetoxy substitution at C-2 on an acetoxyated C-1.

SO1 = Steric influence of one or two acetoxy substitutions
at C-2 and/or C-6 on a phenoxyated C-1.

Table 4. Calculation ^{13}C NMR Chemical Shift(δ) of Compound 1-a

C atom	measured chemical shift (ppm)	Acetoxy				Phenoxy				Steric			Calculated chemical shift (ppm)	Difference (ppm)
		IA	OA	MA	PA	IP	OP	MP	PP	POA	SO	SO1		
1	133.4	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	136.1	-2.7
2	144.2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	143.9	+0.3
3	108.5	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	111.7	-3.2
4	147.5	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	146.5	+1.0
5	112.1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	112.2	-0.1
6	149.9	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	150.5	-0.6
1'	136.6	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	139.2	-2.6
2'	143.8	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	142.9	+0.9
3'	115.1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	113.8	+1.3
4'	146.9	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	146.2	+0.8
5'	115.1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	113.8	+1.3
6'	143.8	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	143.6	+0.2
1''	156.6	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	158.2	-1.6
2''	112.2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	111.2	+1.0
3''	151.3	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	151.6	-0.3
4''	104.8	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	107.7	-2.9
5''	150.5	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	151.6	-1.1
6''	110.7	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	111.2	-0.5
1'''	116.0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	112.8	+3.2
2'''	149.8	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	147.6	+2.2
3'''	113.8	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	112.8	+1.0
4'''	151.0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	151.3	-0.3
5'''	113.8	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	112.8	+1.0
6'''	149.8	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	151.3	-1.5

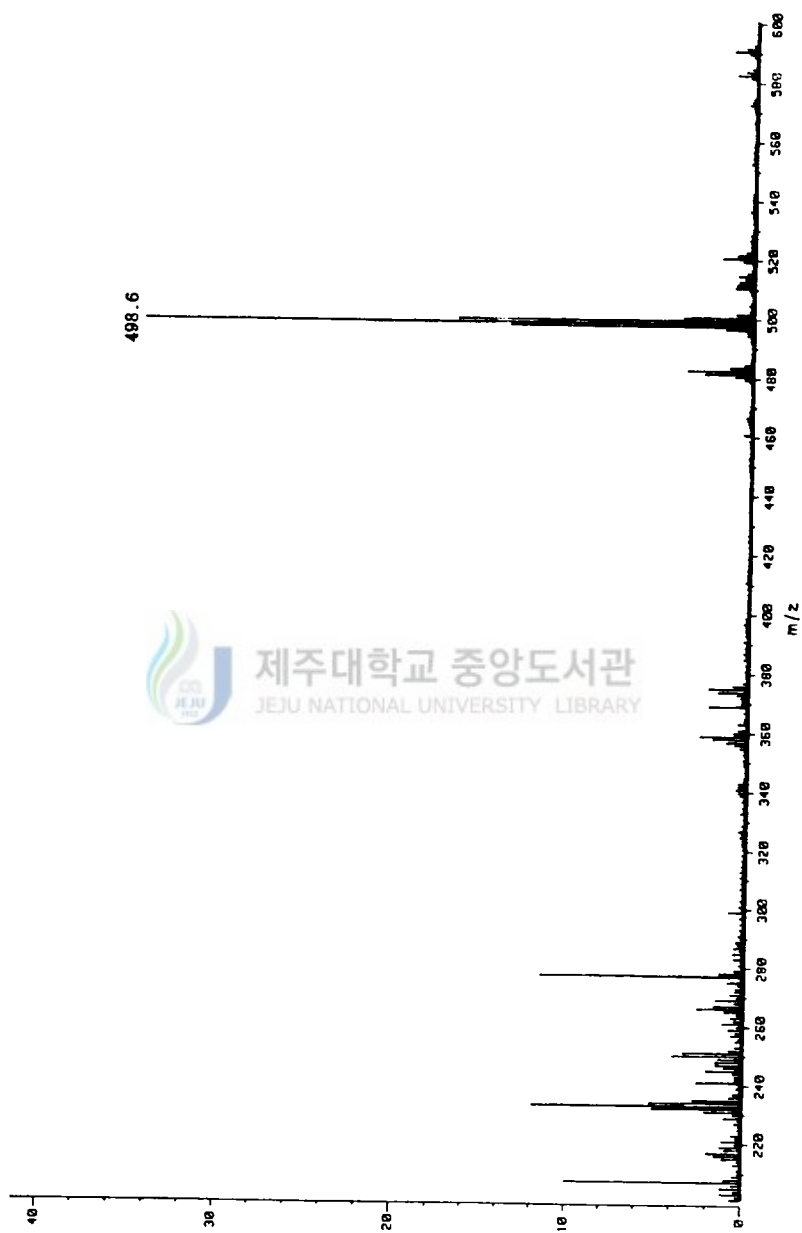
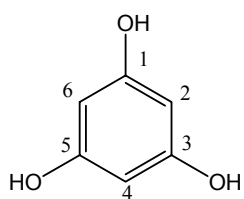


Figure 22. FAB MASS Spectrum of Compound 1

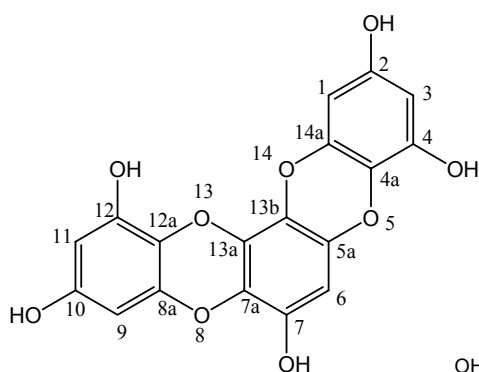
이와 같이 NMR data를 분석하여 compound 1의 분자식이 $C_{24}H_{18}O_{12}$ 임을 예상하였고, FAB MASS 결과 [$m/z = 498.5686(M^+)$]를 통하여 분자량이 498임을 증명하였다(Figure 22).

각각의 분광학적 자료를 토대로 compound 1의 분자구조를 분석한 결과를 토대로 문헌을 검색한 결과 compound 1는 신물질로 추정된다. 따라서 compound 1의 이름을 결정하기 위해 phlorotannin들의 이름을 살펴보았다.

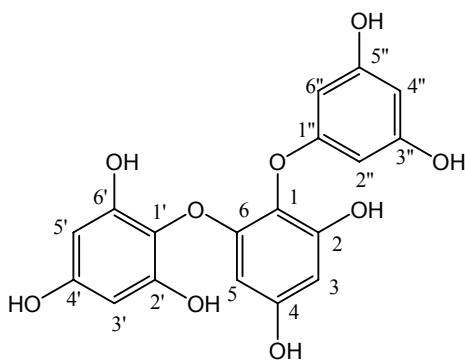
Phlorotannin의 기본단위인 monomer phloroglucinol이 서로 결합하여 dimer를 형성한다. dimer는 aryl형태의 difucol과 ether형태인 diphlorethol로 나눌 수 있다. difucol은 대칭구조이므로 결합부위가 총 3개 이다. diphlorethol 또한 대칭구조 이므로 6개의 결합부위를 가지고 있다 (Figure 24). Compound 1은 difucol과 diphlorethol의 결합인 tetramer이며 현재까지 보고된 같은 형태의 tetramer로는 fucodiphlorethol A, fucodiphlorethol B, fucodiphlorethol C, fucodiphlorethol D가 있으며 발견된 순서에 의해 명명되어 졌다. 따라서 compound 1을 fucodiphlorethol E로 명명하였다(Figure 25).



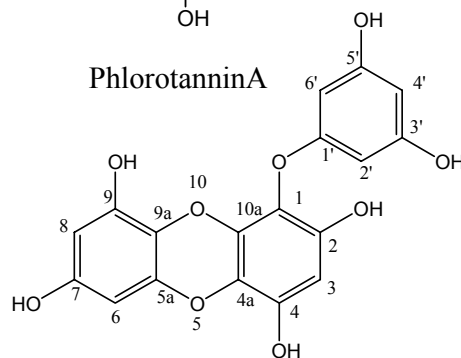
Phloroglucinol



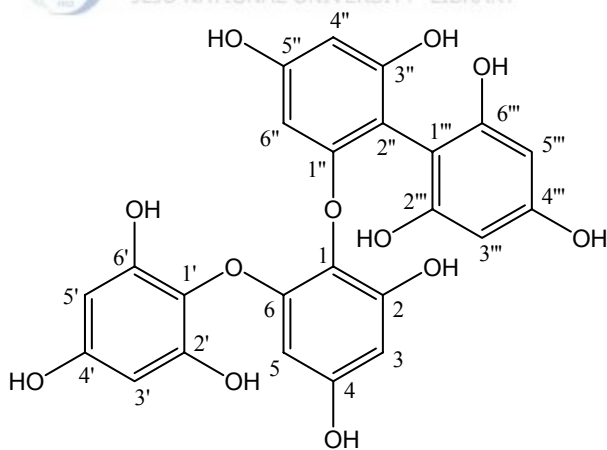
PhlorotanninA



Triphlorethol-A



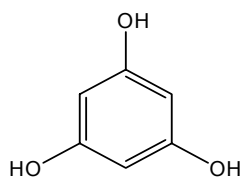
Eckol



Compound 1

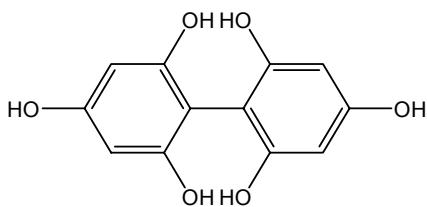
Figure 23. Chemical structures of separated phlorotannins from *Ecklonia cava*

Monomer

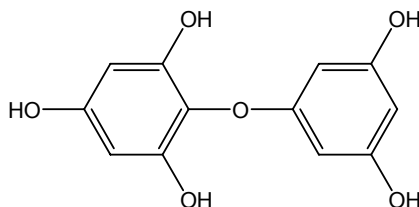


Phloroglucinol

Dimer

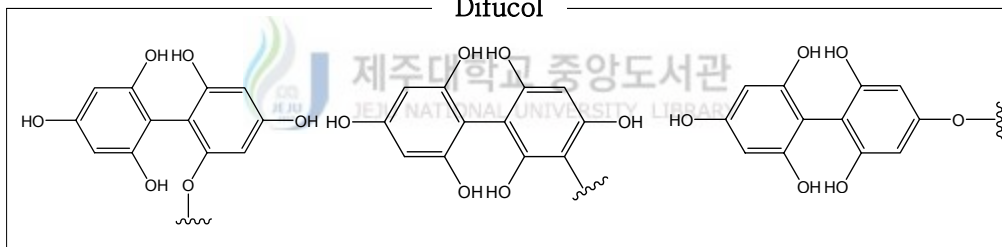


Difucol



Diphlorethol

Difucol



Diphlorethol

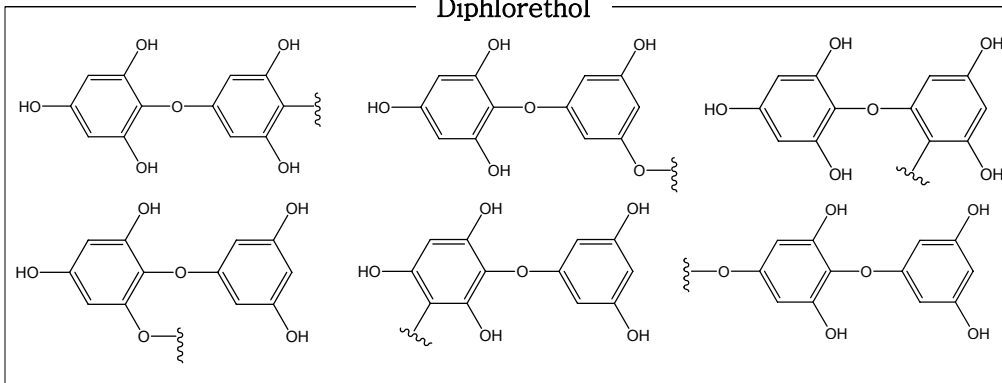
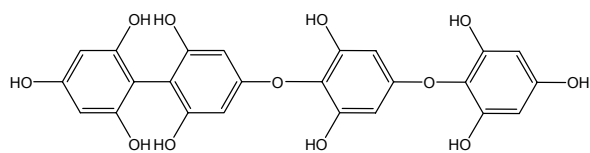
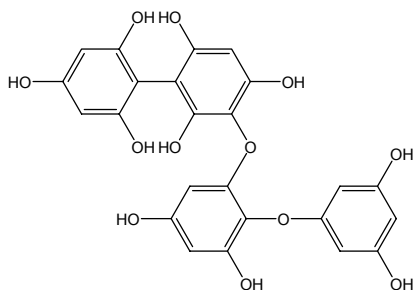


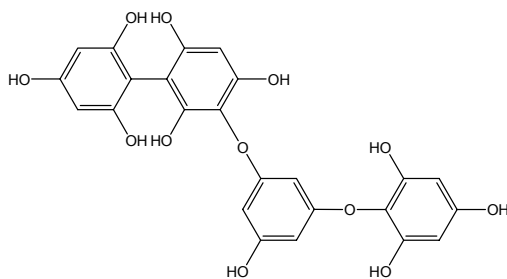
Figure 24. Name of Phlorotannin Monomer and Dimer



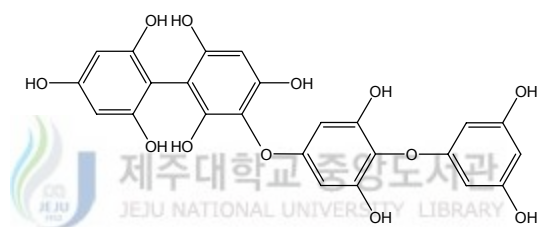
Fucodiphlorethol **A**



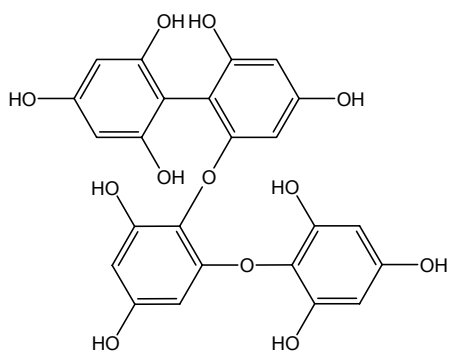
Fucodiphlorethol **B**



Fucodiphlorethol **C**



Fucodiphlorethol **D**



Fucodiphlorethol **E**

Figure 25. Name of Fucophlorethols

3. Phloroglucinol, Triphlorethol-A, Eckol의 항산화활성 결과

3-1 DPPH 라디칼 소거활성

Column chromatography를 통하여 분리된 phloroglucinol과 triphlorethol-A, eckol에 대해 DPPH 라디칼 소거활성 실험을 하여 라디칼 소거 능력을 확인하였다. 그 결과 phloroglucinol의 IC_{50} 수치는 0.38 μ M, triphlorethol-A의 IC_{50} 수치는 0.56 μ M, eckol의 IC_{50} 수치는 0.62 μ M로 매우 우수한 라디칼 소거 활성을 보였다(Figure. 26, 27, 28).

3-2 세포 내 ROS 제거 활성

DCF-DA 실험 방법을 이용하여 phloroglucinol과 triphlorethol-A, eckol의 세포 내 ROS 제거 효과를 살펴보았다. 그 결과 phloroglucinol의 IC_{50} 수치는 0.26 μ M, triphlorethol-A의 IC_{50} 수치는 0.34 μ M, eckol의 IC_{50} 수치는 0.28 μ M로 나타나 이들 phlorotannin들이 세포 내 ROS를 효과적으로 제거함을 알 수 있었다(Figure 29, 30, 31).

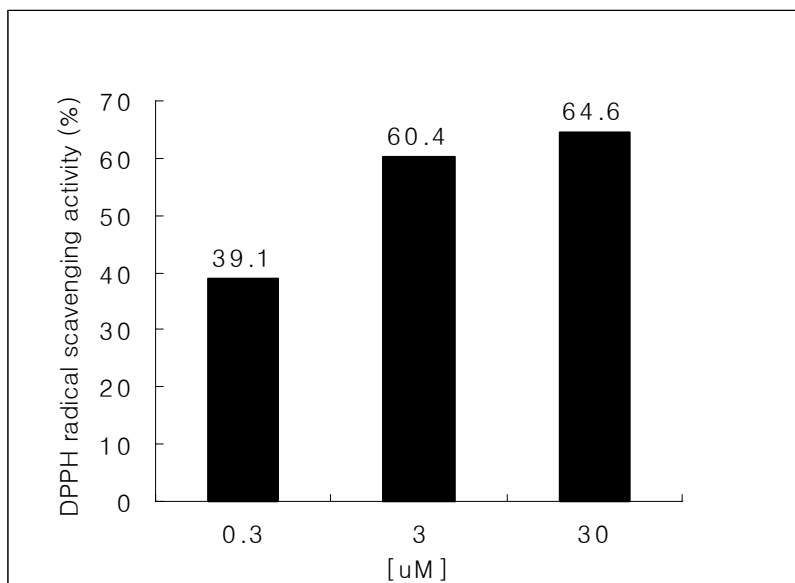


Figure 26. DPPH Radical Scavenging Effect of Phloroglucinol

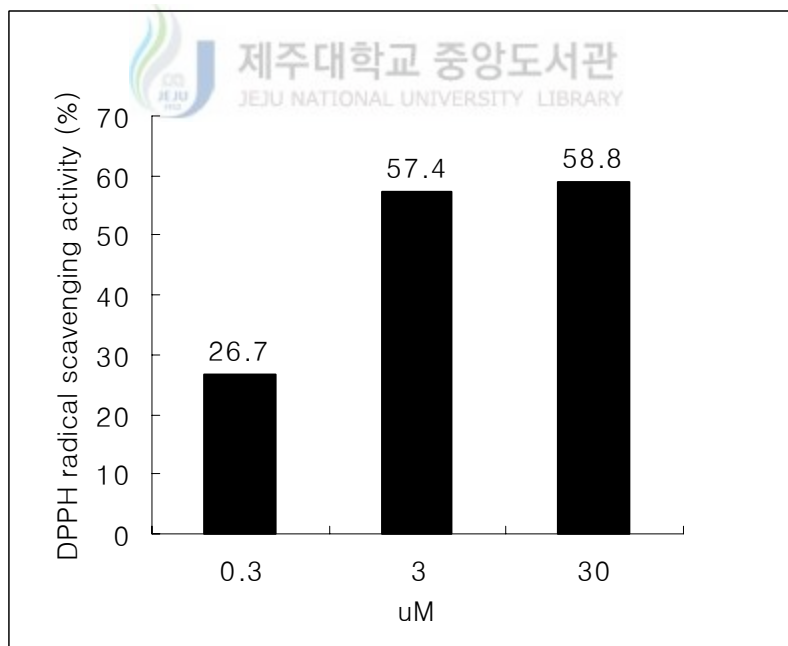


Figure 27. DPPH Radical Scavenging Effect of Triphlorethol-A

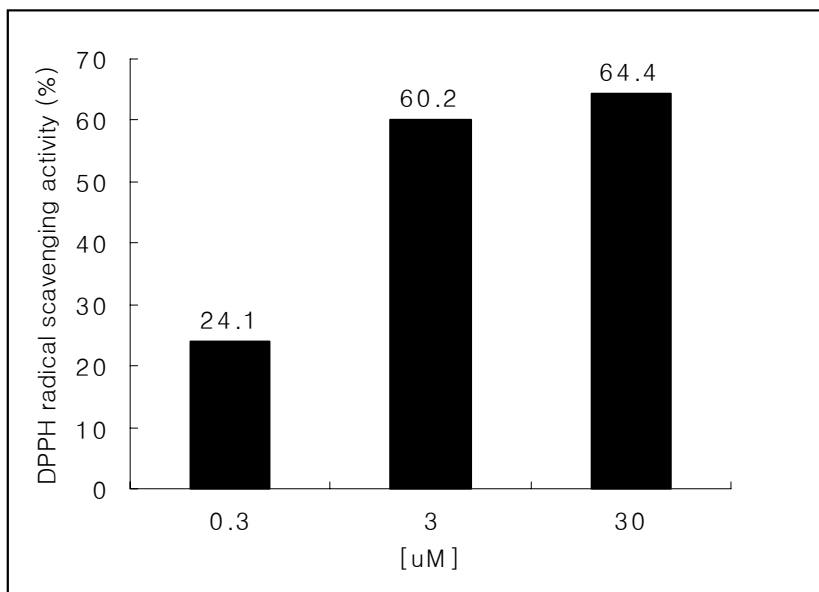


Figure 28. DPPH Radical Scavenging Effect of Eckol

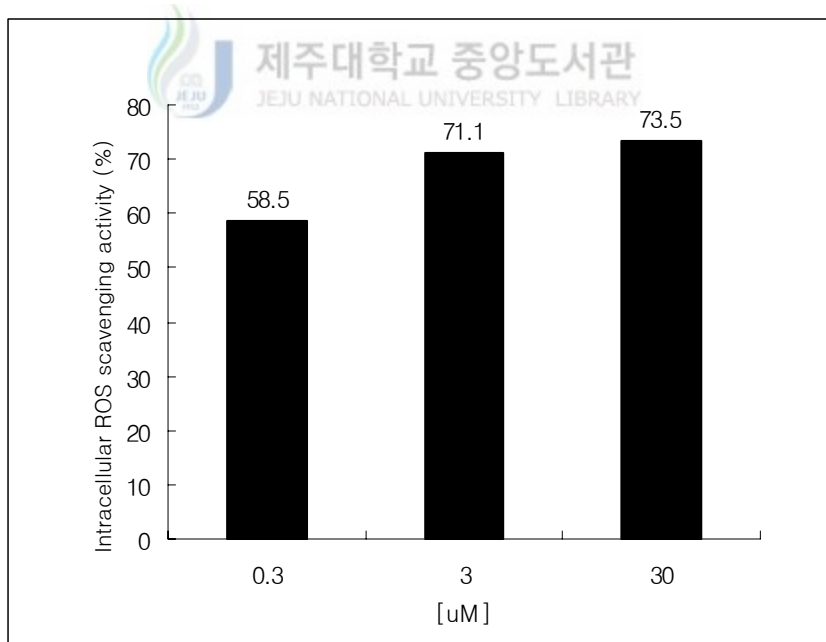


Figure 29. Intracellular ROS Scavenging Effect of Phloroglucinol

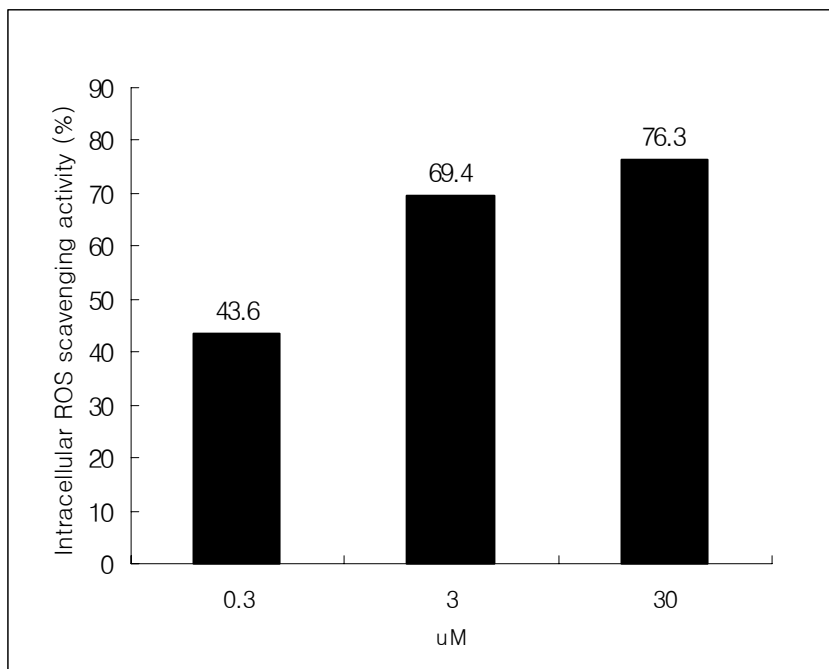


Figure 30. Intracellular ROS Scavenging Effect of Triphlorethol-A

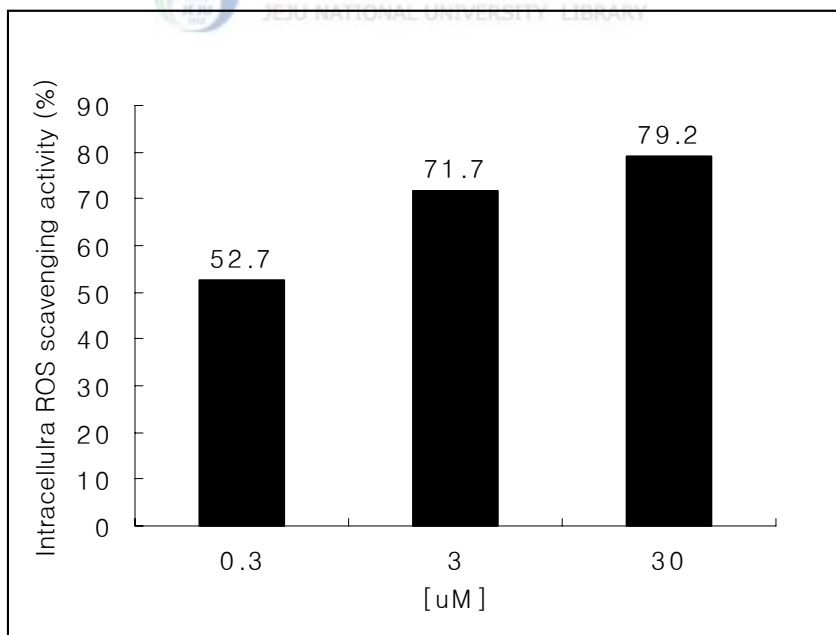


Figure 31. Intracellular ROS Scavenging Effect of Eckol

IV. 결 론

감태 80% 메탄올 추출물을 EtOAc와 물층으로 용매분획하고 EtOAc 분획에 대해 celite column chromatography, sephadex chromatography, Prep-LC를 사용하여 phlorotannin들을 분리하였다. 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 phloroglucinol, eckol, triphlorethol-A, compound 1이 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있었다.

또한 Prep-LC로 분리된 분획 compound 1은 ^1H NMR, ^{13}C NMR로 확인한 결과 phloroglucinol의 사합체로 생각되었다. 보다 정확히 compound 1의 구조를 알아보려고 compound 1과 triphlorethol-A를 아세틸화 시켜 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC, HMBC data를 비교한 결과 triphlorethol-A에 phloroglucinol이 aryl형태로 결합한 구조임을 확인하여 신물질인 fucodiphlorethol E로 결론지었다.

Column chromatography를 통하여 분리된 phloroglucinol과 triphlorethol-A, eckol의 DPPH 라디칼 소거활성의 결과가 각각 $\text{IC}_{50} = 0.38 \text{ uM}$, 0.56 uM , 0.62 uM 으로 매우 우수한 효과가 나타났다. 또한 세포 내 ROS제거 활성 실험에서 $\text{IC}_{50} = 0.26 \text{ uM}$, 0.34 uM , 0.28 uM 으로 phloroglucinol과 triphlorethol-A, eckol의 항산화효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 실험결과를 통하여 제주도에 풍부하게 서식하고 있는 감태를 이용한 항산화제 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

V. 참고문헌

1. 정지형 : 해양생물로부터 생리활성물질 탐색. 수산과학의 하이테크. 219-220 부산수산대학교 해양과학공동연구소(1996)
2. 김진아 : 해조류의 채집시기·조리·가공방법에 따른 주요 성분 및 생리활성 변화와 활성물질의 분리동정 -제주도 연안 툃과 감태를 중심으로- 이화여자대학교 대학원 2003학년도 박사학위 청구논문
3. Shibata. T., Yamaguchi. K., Nagamura K., Kawaguchi, S., and Nakamura, T.,: Inhibition activity of brown algae phlorotannins against glycosidases from the viscera of turban shell *Turbo cornutus*, *Eur. J. Phycol.*, *37*, 493, (2002)
4. Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., and Ang, P. O : Evaluation of anioxydative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*, *J. Agric. Food Chem.*, *50*, 3862, (2002)
5. Nakamura, T., Shibata, T., Yamaguchi. K., Tanama, R. : Antioxydant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science*, *23*, 923, (1996)
6. Shibata. T., Fujimoto, K., Nagayama. K., Yamaguchi. K.,

- Nakamura, T.: Inhibition activity of brown algae phlorotannins against hyaluronidase, *International Journal of Food science and Technology*, 37, 703, (2002)
7. Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., and Nagamura, T. : Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia* Kurome. *J. of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 889, (2002)
8. Fukuyama, X., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nagayama, Y. and Takahashi, M. : Antiplasmin inhibitor. V. Structures of novel dimeric eckols isolated from the brown alga *Ecklonia* Kurome. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2438, (1989)
9. 박종철, 최재수, 송상호, 최명락, 김광용, 최종원 : 해조류 추출물과 페놀성화합물의 in vitro 및 in vivo 간 보호활성 생약학회지, 28, 239~246 (1997)
10. Hye Sook KANG, Hae Young CHUNG, Jee Hyung JUNG, Byeng Wha SON, and Jae Sue CHOI : A New Phlorotannin from the Brown Alga *Ecklonia stolonifera*, *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 1012-1014 (2003)
11. 김은숙 : 모자반과 패로부터의 2차 대사물질의 분리 및 연구, 한밭대학교 산업대학원 2004학년도 석사학위 청구논문

12. Mi-Jeong AHN, Kee-Dong YOON, So-Young MIN, Ji Suk LEE, Jeong Ha KIM, Tae Gyun KIM, Seung Hee KIM, Nam-Gil KIM, Hoon HUH, and Jinwoong KIM : Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease by Phlorotannins from the Brown Alga *Ecklonia cava*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 544-547 (2004)
13. 김외경, 이태기, 박영범, 박덕철, 이용우, 여생규, 박영호, 김선봉 : 해조류 추출물의 Xanthin oxidase 저해작용 및 저해 인자의 분리. *한국식품영양과학회지*, 25, 1069, (1996)
14. 최병욱, 이봉호, 강기정, 이은석, 이남호 : 해조류 및 생약의 Tyrosinase 억제 활성 검색 생약학회지, 29, 237-242 (1998)
15. Jin-Ah Kim, Jong-Mee Lee, Dong-Bum Shin, Nam-Ho Lee : The Antioxidant activity and tyrosinase Inhibitory activity of Phlorotannins in *Ecklonia cava*, *Food Sci. biotechnol.*, 13, 476~480 (2004)
16. Shu-fung Lo, Satish Manohar NALAWADE, Vanisree MULABAGAL, Susan MATTHEW, Chung-Li CHEN, Chao-Lin KUO, Hsin-Sheng TSAY : In vitro Propagation by Asymbiotic Seed Germination and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) Radical Scavenging Activity Studies of Tissue Culture Raised Plants of Three Medicinally Important Species of *Dendrobium*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 731-735 (2004)

17. Blois M. S. : *Nature(London)*, 181, 1199-1200 (1958)
18. Kyoung Ah Kang, Kyoung Hwa Lee, Sungwook CHAE, Young Sang Koh, Byoung-Sam yoo, Ju Ho Kim, Young Min Ham, Jong SEOK Baik, Nam Ho Lee, Jin Won Hyun : Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-a lung fiboblast aganinst hydrogen peroxide include cell damage. *Free Radical Research*, August 39, 883-892 (2005)
19. Kyuong Ah Kang, Kyoung Hwa Lee, Sungwook Chae, Rui Zhang, Myung Sun Jung, Youngki Lee, So Young Kim, Hee sun Kim, Hong Gu Joo, Jae Woo Park, Young Min Ham, Nam Ho Lee, Jin Won hyun : Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, 579, 6295-6304 (2005)
20. Kyuong Ah Kang, Kyoung Hwa Lee, Sungwook Chae, Rui Zhang, Myung Sun Jung, Young Min Ham, Jong seok Baik, Nam Ho Lee, Jin Won hyun : Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation, *Journal of Cellular Biochemistry*, Oct 7 (2005)
21. Carl P. LeBel, Harry Ischiropoulos, Stephen C. Bondy : Evaluation of the probe 2',7'-Dichlorofluorescin as an

Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 227-231 (1992)

22. Jae Sue Choi, Ji Hyeon Lee, Jee Hyung Jung : The screening of Nitrite Scavenging Effect of Marine Algae and Active Principles of *Ecklonia Stolonifera*, *J. Korean Fish. Soc.*, 30, 909-915 (1997)

23. S. Wegner-Hambloch, K.-W. Glombitza : Increments for Calculation of the ^{13}C NMR Shift of Acetylated Polyphenols Considering steric Interactions. *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, 23, 358-360 (1985)



감사의 글

끝이 보이지 않던 길고 긴 여정을 달려왔습니다.

숨도 차고 다리에 힘도 빠지고 목도 마르고 이 길이 맞는지 혼란스러웠습니다.

매순간 마다 물도 나눠주시고 손도 잡아주시고 지도도 꺼내서 보여주신 분들이 있기에 오늘 이 자리에 설 수 있었습니다.

4년 동안 저의 수많은 질문거리를 싫은 표정 하나 없이 늘 받아주시고 부족한 저를 믿고 지도 해 주신 이남호 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 항상 격려와 관심으로 또는 엄한 질책으로 저를 아껴 주신 한성빈 교수님, 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

또한 곁에서 늘 힘이 되어 주신 실험실 가족들... 종석 선생님, 진석 선생님, 홍철 선생님, 태현 선생님, 정미 선생님, 지영언니와 굳은 일을 묵묵히 도와준 형주오빠, 성준오빠, 성훈이, 네아즈, 바름이, 미연이, 상희, 려경이, 성환이.. 모두에게 감사의 마음을 전합니다.

그리고 같이 졸업하는 기주오빠, 원혁 오빠, 희정이와 많은 관심으로 격려해 주신 화학과의 선배님들, 후배님들, 동기들 감사합니다.

연락도 자주 못하고 부탁만하는 나를 항상 응원해 준 친구들 감사하고 사랑합니다.

늘 옆에서 든든한 버팀목이 되어준 경범오빠, 감사합니다.

마지막으로 막내딸의 늦은 귀가로 매일 밤잠을 설치게 했던 어머니와 언니, 하숙생같은 딸을 늘 걱정으로 시켜봐 준 가족들...그리고 먼 곳에서 항상 응원해 주신 아버지, 모두 고맙습니다. 그리고 사랑합니다.

다시 출발선에 서 있습니다. 또 얼마나 먼 길을 가야할 지 알 수 없지만 더 배우고 깨달아가며 세상에 꼭 필요한 사람이 되도록 노력 하겠습니다.

2005년 12월
함 영 민 올림