

이학석사 학위논문

갈조류 짜배기 모자반(*Sargassum
siliquastrum*)으로부터 생리활성 성분의 분리 및
구조결정

Isolation and Structure Determination of Bioactive
Constituents from the Brown Alga *Sargassum siliquastrum*

지도교수 서 영 완

2007년 8월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

이 정 임

본 논문을 이정임의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2007년 8월

위원장 이학박사 임 선 영



위 원 수산학박사 최 철 영



위 원 이학박사 서 영 완



한국해양대학교 대학원

목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
Abbreviations -----	vi
List of symbols -----	vii
Abstract -----	1
1 서론 -----	4
2 실험 방법 -----	8
2-1. 재료 -----	8
2-2. 시약 -----	8
2-3. 기기 -----	9
2-4. 추출, 분획 및 분리 -----	9
(1) 추출 및 분획 -----	9
(2) 모자반의 활성 성분 분리 -----	10
2-5. 항산화 활성 실험 -----	12
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	12
(2) Peroxynitrire 소거 활성 -----	15
2-6. 세포수준의 항산화 활성 실험 -----	18
(1) 세포배양 -----	18
(2) Cell viability의 측정-----	18
(3) ROS (total free radical 측정) -----	19
(4) DNA 산화 생성물의 측정-----	19
(5) GSH 함량 측정-----	19

2-7. <i>in vitro</i> 항비만 실험	21
(1) 3T3-L1 세포의 배양 및 지방세포로의 분화 유도	21
(2) Glycerol 함량의 측정	21
(3) TG 함량의 측정	22
3. 결과 및 고찰	23
3-1. 모자반에서 분리된 화합물들의 구조결정	23
3-2. 항산화 활성	61
(1) 파배기 모자반 조추출물과 용매분획의 활성	61
1) DPPH radical 소거 활성	61
2) Peroxynitrite 소거 활성	62
(2) 파배기 모자반에서 분리한 compounds 1-7 활성	65
1) DPPH radical 소거 활성	65
2) Peroxynitrite 소거 활성	66
3-3. 세포 수준에서 항산화 활성 효과	68
(1) 파배기 모자반 조추출물과 용매분획의 활성	68
1) MTT assay	68
2) ROS (Total free radical) 소거 활성	71
3) DNA 산화	73
4) GSH 함량 측정	74
(2) Compounds 1-7 의 활성	76
1) MTT assay	76
2) ROS (Total free radical) 소거 활성	77
3) GSH 함량 측정	78
3-4. <i>in vitro</i> 항비만 실험	79
(1) Glycerol 분비 및 triglyceride 축적	79
1) 파배기 모자반 조추출물과 용매분획의 효과	79
4. 요약 및 결론	81
5. 참고문헌	83

List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>Sargassum siliquastrum</i> -----	10
Scheme 2. Isolation of compounds 1-7 from <i>Sargassum siliquastrum</i> -----	11
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect-----	14
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect-----	17

List of tables

	Page
Table 1. ^1H NMR Spectral Data for Compounds 1-2	29
Table 2. ^{13}C NMR Spectral Data for Compounds 1-2	30
Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectral Data for Compound 3	31
Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectral Data for Compound 4	32
Table 5. ^1H NMR Spectral Data for Compounds 5-6	33
Table 6. ^{13}C NMR Spectral Data for Compounds 5-6	34
Table 7. Comparison of NMR spectral data for compound 5 with those for sargachromanol E	35
Table 8. Comparison of NMR spectral data for compound 6 with those for sargachromanol D	35
Table 9. ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectral Data for Compound 7 .	36
Table 10 DPPH radical scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrum</i> (EDA(%)).	62
Table 11 Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrum</i> on ONOO ⁻ from SIN-1.	64
Table 12 Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrum</i> on authentic ONOO ⁻	64
Table 13 .Scavenging effect of compounds 1-7 from <i>Sagassum siliquastrum</i> on DPPH radical	66
Table 14 Scavenging effect of compounds 1-7 from <i>Sargassum siliquastrum</i> on ONOO ⁻ from SIN-1.	68
Table 15 Scavenging effect of compounds 1-7 from <i>Sargassum siliquastrum</i> on authentic ONOO ⁻ .	68

List of figures

	Page
Fig. 1	Photograph of <i>Sargassum siliquastrum</i> . 7
Fig. 2	Scavenging of the DPPH radical by phenol (Blois, 1958). 13
Fig. 3	Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR123. 16
Fig. 4	Chemical structure of compounds 1-4 from <i>Sagassum siliquastrum</i> 37
Fig. 5	Chemical structure of compounds 5-7 from <i>Sagassum siliquastrum</i> 38
Fig. 6	¹ H NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 40
Fig. 7	¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 40
Fig. 8	gDQCOSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 41
Fig. 9	TOCSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 41
Fig. 10	gHMQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 42
Fig. 11	gHMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD. 42
Fig. 12	¹ H NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . 43
Fig. 13	¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . 43
Fig. 14	gDQCOSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . 44
Fig. 15	TOCSY spectrum of compound 2 in CDCl ₃ 44
Fig. 16	gHMQC spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . 45
Fig. 17	gHMBC spectrum of compound 2 in CDCl ₃ . 45
Fig. 18	¹ H NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . 46
Fig. 19	¹³ C NMR spectrum of compound 3 in CDCl ₃ . 46
Fig. 20	gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.. 47
Fig. 21	TOCSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD. 47
Fig. 22	gHMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.. 48
Fig. 23	gHMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.. 48
Fig. 24	¹ H NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . 49
Fig. 25	¹³ C NMR spectrum of compound 4 in CDCl ₃ .. 49
Fig. 26	gDQCOSY spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . 50
Fig. 27	TOCSY spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . 50
Fig. 28	gHMQC spectrum of compound 4 in CDCl ₃ 51
Fig. 29	gHMBC spectrum of compound 4 in CDCl ₃ . 51

Fig. 30	¹ H NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	52
Fig. 31	¹³ C NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	52
Fig. 32	gDQCOSY spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	53
Fig. 33	TOCSY spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	53
Fig. 34	gHMQC spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	54
Fig. 35	gHMBC spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	54
Fig. 36	¹ H NMR spectrum of compound 6 in CDCl ₃ .	55
Fig. 37	¹³ C NMR spectrum of compound 6 in CDCl ₃ .	55
Fig. 38	gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	56
Fig. 39	TOCSY spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	56
Fig. 40	gHMQC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	57
Fig. 41	gHMBC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	57
Fig. 42	¹ H NMR spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	58
Fig. 43	¹³ C NMR spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	58
Fig. 44	gDQCOSY spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	59
Fig. 45	TOCSY spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	59
Fig. 46	gHMQC spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	60
Fig. 47	gHMBC spectrum of compound 7 in CDCl ₃ .	60
Fig. 48.	Effect of crude extracts from <i>Sargassum spiliquastrum</i> on viability of HT1080 cell	70
Fig. 49.	Effect of its solvent fractions from <i>Sargassum spiliquastrum</i> on viability of HT1080 cell	70
Fig. 50	Cellular radical scavenging effect of crude extracts from <i>Sagassum siliquastrm</i> in HT1080 cell..	72
Fig. 51	Cellular radical scavenging effect of its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrm</i> in HT1080 cell..	72
Fig. 52	Effect of crude extractions from <i>Sagassum siliquastrm</i> on genomic DNA oxidation	73
Fig. 53	Effect of its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrm</i> on genomic DNA oxidation	73
Fig. 54	Effect of crude extracts from <i>Sagassum siliquastrm</i> on GSH level in HT1080 cell.	75

Fig. 55	Effect of its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrm</i> on GSH level in HT1080 cell.	75
Fig. 56	Effect of compounds 1-7 from <i>Sargassum spiliquastrum</i> on viability of HT1080 cell	76
Fig. 57	Protective effect of compounds 1-7 on oxidative stress.	77
Fig. 58	Effect of compounds 1-7 from <i>Sagassum siliquastrm</i> on GSH level in HT1080 cell.	78
Fig. 59	Effect of crude extracts from <i>Sagassum siliquastrm</i> on glycerol secretions and triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes.	80
Fig. 60	Effect of its solvent fractions from <i>Sagassum siliquastrm</i> on glycerol secretions and triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes.	80

List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO·	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
·OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxyntirite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
U _{max}	: maximal velocity

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift

**Isolation and Structure Determination of Bioactive Constituents from the
Brown Alga *Sargassum siliquastrum***

Jung Im Lee

*Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime University,
Busan, 606-791, Korea*

Abstract

Marine macroalgae are widely recognized as very prolific sources of both biologically active and structurally unique secondary metabolites. Terpenoids, acetogenins, and mixed metabolites of uncommon carbon skeletons and functionalities belong to the major groups of metabolites from these plants. Meroterpenoids are mixed biosynthetic products which contain terpenoids and polyketides fragments. Particularly, meroterpenoids of chromene structural class were found abundantly within the brown algae and revealed a variety of bioactivities such as cytotoxicity, antioxidant activity, anthelmintic activity, and inducement of the larval settlement of a hydrozoan.

As a part of our search for novel bioactive compounds from marine algae, the brown alga *Sargassum siliquastrum* was collected off the shore of Jeju Island. The collected samples of *Sargassum siliquastrum* were briefly dried under shade and repeatedly extracted for 2 days with a mixture (1:1) of acetone-CH₂Cl₂ (1.5 L X 2) and MeOH (1.5 L X 2), respectively. The combined crude extracts of

Sargassum siliquastrum were fractionated into *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, and water fractions.

Antioxidant activities of *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, and water fractions including crude extracts of *Sargassum siliquastrum* were evaluated using 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical, authentic ONOO⁻, and ONOO⁻ generated from SIN-1. Scavenging activity of each fraction on DPPH radical increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-hexane > *n*-BuOH > H₂O fractions, while that of each fraction on authentic ONOO⁻ and induced ONOO⁻ from SIN-1 increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-BuOH > H₂O > *n*-hexane fractions.

On the basis of the above results, purification of the 85% aq. MeOH fraction using C₁₈ reversed-phase column, followed by HPLC, resulted in the isolation of three new meroterpenoids (compounds **5-7**) and four known meroterpenoids (compounds **1-4**) of chromene class. The structure of the isolated compounds was established by extensive 2D NMR experiments such as ¹H gDQCOSY, TOCSY, NOESY, gHMBC, and gHMBC, and by comparison with published spectral data.

In our measurement for evaluating antioxidant activity of compounds **1-7** using DPPH radical, authentic ONOO⁻, and ONOO⁻ generated from SIN-1, all of them exhibited significantly high activities.

The protective effect of compounds from *Sargassum siliquastrum* on H₂O₂-induced oxidative stress was examined in HT1080 cells. The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). All solvent fractions including crude extracts of *Sargassum siliquastrum* not only significantly decreased levels of intracellular ROS in a dose-dependent manner but also exhibited a protective effect on oxidative damage of purified genomic DNA. In addition, they increased intracellular GSH level in a dose dependent manner. Compound (**1-7**) significantly

decreased those of intracellular ROS while they increased that of intracellular GSH at concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Therefore, these results suggested that these active compounds from *Sargassum siliquastrum* could be developed as a candidate for potential natural antioxidant related to oxidative stress.

Antiobesity effect of each fraction was estimated by measuring levels of glycerol and triglyceride. When 3T3-L1 adipocytes are treated with a good antiobestic material, glycerol secretion is increased and triglyceride (TG) accumulation is reduced, compared to control adipocytes. Among tested samples, 85% aq. MeOH and n-BuOH fractions revealed very good antiobesitic effect, significantly increasing glycerol secretion and decreasing TG accumulation, respectively. Based upon these results, it is suggested that further investigation should be performed on the isolation and identification of the antiobesitic components in its active fraction.

1. 서론

바다는 사람들에게 늘 가까이 있어 친숙하게 여겨 왔지만 그 크기가 방대하여 알 수 없는 미지의 세계나 동경의 대상으로 여겨 왔다. 지구 면적의 70% 이상을 차지하고 있는 바다는 그 광대한 크기 속에 다양한 자원들이 존재하는데, 사람들이 쉽게 생각할 수 있는 생물자원뿐만 아니라, 광물자원, 에너지자원 등 무한한 자원을 지니고 있으며, 육상에서 볼 수 없는 독특한 자원을 가지고 있다.

그 중 해양생물자원은 어류, 갑각류, 연체동물류, 포유류, 해조류 등 예로부터 인간의 식품으로 사용되어져 수산자원으로써 높은 가치를 가지고 있으며, 현재는 생명공학 기술을 이용하여 유용물질을 추출하는 등 신물질 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.¹⁾

선진국에서는 1960년대부터 해양생물로부터 신물질 및 유용물질이 중요한 가치가 있다는 것을 인지하고 막대한 투자와 연구를 통해 해양생물로부터 육상생물에서 알려지지 않았던 새로운 형태의 화합물을 분리하였으며, 분리한 물질들 중 상당수가 항암성, 항바이러스성, 항균성, 항산화성 및 기타 우수한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 그 중 해조류에서만 acetogenins, oxylipins, polyphenyl ethers, terpenoids, steroids, nucleosides 등의 4,500여 물질이 보고되고 있으며, 이 또한 항균, 항암, 항바이러스, 효소활성저해 등의 생리활성을 나타내고 있다.²⁾

해조류는 서식 위치에 따라 광합성을 위한 다른 색소체계를 가지며, 이에 따라 녹조류, 갈조류, 홍조류로 분류 할 수 있다. 녹조류는 대부분 수심이 얇은 바다에 서식하며, 광합성시 사용되는 파장이 긴 적색광을 흡수하는 엽록소라는 색소를 가지고 있어 초록빛을 띠고 있다. 이런 녹조류에 대한 천연물 화학적 연구는 열대 해역에 서식하는 석회조(caulerpale)에만 연구가 집중되어 있으며, 이는 석회조가 열대 해역의 생태계에 매우 중요한 위치를 차지하며, 초식

성 동물로부터 방어를 위한 물리화학적 보호를 취하고 있기 때문이다. 녹조류에서 발견되는 대사물질은 과반수 이상이 1,4-diacetoxybutadiene으로 farnesol이나 genanyl geraniol로부터 생합성된 terpenoids이다.

갈조류는 녹조류보다 깊은 물속에서 자라며 특수한 카로티노이드 색소, 후코잔틴이 엽록소를 덮고 있어 특유의 갈색을 띠며, 광합성을 위한 엽록소 뿐만 아니라 크산토펜을 함유하고 있어 수심 30 m 에서도 성장할 수 있다. 대부분의 갈조류는 담수산 3속을 제외하고 모두 해양에서 발견되고 있으며, 거의 모든 고위도 지방에서 다량으로 서식한다. 주로 툿, 미역, 다시마, 대황, 모자반 등이 존재하며, 길이가 몇 미터씩 되는 대형 조류가 많아 해중림을 이루어 아름다운 수중 경관을 연출하기도 한다. 갈조류는 polysaccharides를 얻기 위해 상업적으로 재배되어지고 있으며, 양질의 식물성 섬유인 알긴산을 많이 함유하고 있어, 건강식품으로 알려져 있다.³⁾ 갈조류는 화학 전령자 역할을 하는 간단한 구조를 가진 lipid로부터 복잡한 구조를 지닌 phlorotannins을 포함 하고 있으며, 질소화합물의 거의 존재하지 않고 terpene계 물질이 많이 존재한다.

홍조류는 가장 많은 연구가 된 조류로 빛의 파장이 짧은 청색광을 흡수할 수 있는 피코시아닌과 피코에리드린을 가지고 있어 붉게 보이며, 다른 조류보다 수심 깊은 곳까지 서식한다. 그 종류 또한 다양하며, 고위도에서 저위도로 갈수록 종류가 많아지고 한·온대 지역이 서식하는 종의 크기가 크다. 홍조류의 대표적인 예로 우뭇가사리, 김이 있으며, 한천이나 카리기난을 가공하여 상업적으로 많이 사용되고 있다. 주로 terpenoids와 acetogenins이 주로 분리되어진다.

이렇듯 해조류는 다양한 생물 종을 확보하고 있으며, 새롭고 다양한 물질들을 함유하고 있다. 우리나라에서는 이런 해조류를 예로부터 김, 미역, 파래, 다시마 등 식품으로 섭취하였으며, agar, alginates, carrageenan과 같은 해조류 다당류를 식품이나 약재의 원료로 사용하여왔다.^{4), 5)} 해조류는 체내의 산성 노폐물을 제거하고 이차적으로 발생 할 수 있는 독성을 제거하며, 또한 양질의 식

물성 섬유인 알긴산을 많이 함유하고 각종 미네랄과 비타민 또한 다량 함유하고 있어 활성 산소와 과산화 지질의 생성을 억제한다.³⁾ 고혈압과 동맥경화 등의 방지에도 효과가 있으며, 장암을 비롯한 각종 암의 발생을 억제한다.⁶⁾ 특히 미역, 다시마 같은 갈조류는 항산화 항암, 항종양 항비만 등에 효과가 있음이 알려진 바 있으며,^{7), 8)} 이런 연구 결과를 바탕으로 건강식품으로 현재 널리 보급되어있다.

그 외에도 해조류는 카드뮴과 같은 중금속을 흡수⁹⁾ 할 뿐만 아니라, 생물들 간의 정보전달이나 화학적 방어를 하는 이차 대사산물을 생산하고 있다.

해조류 산업발달의 조건을 갖추고 있으며, 해조류 양식을 하는 나라 중 몇 안 되는 나라로써, 해조류 산업에 대한 가치는 무궁무진하다. 현재 선진국에서는 해조류로부터 얻어지는 물질들의 양이 충분하지 못해서, 상업화에 어려움을 겪고 있지만 우리나라는 해조류 양식을 통해 대량생산이 가능하며, 최근 모자반 양식을 성공함으로써, 그 개발 가능성은 더욱 커졌다고 할 수 있다. 하지만 아직 우리나라의 해조류에 대한 천연물화학적 연구는 아직 미흡하며, 유기용매 조추출물의 활성 스크리닝 정도의 수준에 불과한 실정이다. 생물은 서식지역에 따라 상이한 천연물을 생성하므로 우리나라 연안에 서식하는 해조류는 비록 다른 나라와 동일종이라 하더라도 비교적 연구가 집중되지 않았기 때문에 새로운 생리활성물질을 함유할 가능성이 높다고 할 수 있다.

이러한 연구배경하에 우리나라 제주도 및 부산 연안에 서식하는 해조류 시료를 채집하여, 항산화, NO 생성억제 등 기초적인 생리활성을 검색하였으며 NMR 분광분석과 기초생리활성검색 결과를 종합하여 파배기 모자반을 연구대상 해조류로 선정하였다. 본 실험에 사용된 해조류는 파배기 모자반으로써, 갈조류의 모자반목 모자반과에 속하며 한국과 일본에 주로 분포하고 조간대 하부로부터 수심이 깊은 곳까지 서식하며 단단한 바위 기질에 붙어 자란다. 몸의 길이는 2~3 m 이며, 생육지 환경에 따라 외형의 변화가 매우 심하고 줄기는 대부분이 꼬여 있다. 이미 앞선 연구에서 chromanol 계열의 Sargachromanol

A-P 가 분리 보고 된바 있으며¹⁰⁾, 분리된 화합물은 항산화 활성 효과가 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 파배기 모자반에서 새로운 화합물들을 분리하고 여러 가지 생리활성 검색을 통하여 새로운 생리활성물질을 발견하고자 한다.

검색 방법은 in vitro 상에서 DPPH radical 소거 활성과 authentic peroxinitrate 소거 활성을 측정하고, 세포내에서는 ROS를 검색하고, 산화스트레스에 의한 DNA 산화 정도 및 항산화제 방어기작으로 사용되는 GSH 함량의 측정함으로써, 파배기 모자반의 항산화 활성을 측정하고자 하며, 항비만과 관련하여, in vitro에서 파배기 모자반의 조추출물을 이용하여 항비만관 관련된 triglyceride 와 glycerol 함량을 측정하고자 한다.

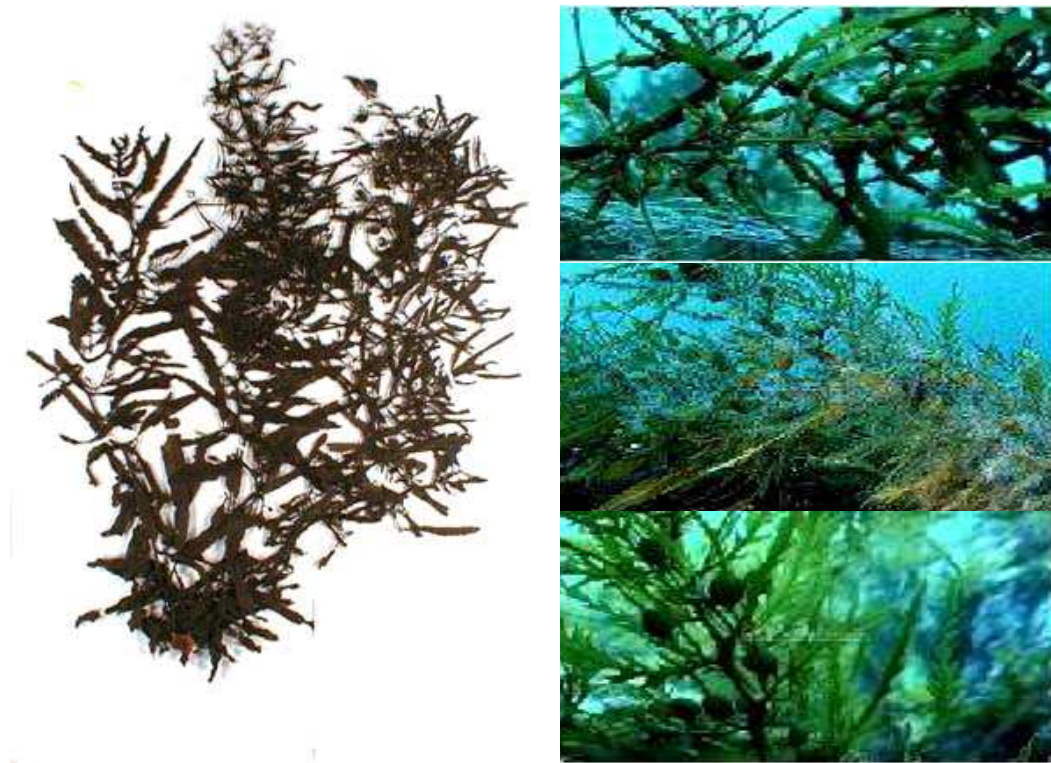


Fig. 1. *Sargassum siliquastrum*

2. 실험 방법

2-1. 재료

실험에 사용한 모자반(*Sargassum siliquastrum*)는 2003년 5월 제주도 귀덕에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25 °C에서 보관하였다가 추출하였다.

2-2. 시약

Column packing materials은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μ m)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F254s (0.5mm, Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5% H₂SO₄를 분사하여 발색되는 것을 관찰하였다. 추출 및 분획, column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 사용하였다. Varian RI detector와 high performed liquid chromatography (HPLC, Dionex P580)를 사용하여 정제·분리하였다. 사용한 HPLC column은 YMC pack ODS-A (250×10 mm, S 5 μ m, 12 mm)을 사용하였고, guard column (7.5×4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl₃ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%), CD₃OD (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydorhodamine 123 (DHR 123), penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid) 은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxyntirite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 항산화 실험에 사용하였다.

세포 배양에 필요한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 Sigma에

서 구입하였고 (ST. Louis, MO, USA), FBS (Fetal Bovine Serum)는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. Glycerol에 필요한 reagent는 Sigma에서 구입하였으며, triglyceride에 필요한 reagent는 신양화학에서 구입하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

2-3. 기기

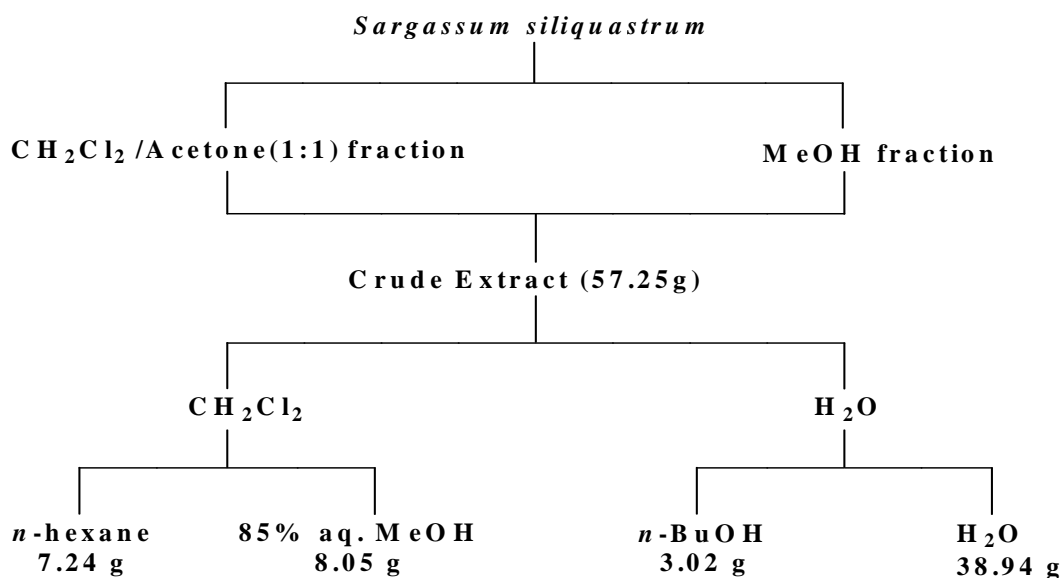
$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. 비선광도는 polarimeter (Perkin elmer : U.S.A, 341)를 사용하여 측정하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio- TEK instruments, USA)가 항산화 활성 측정에 사용되었으며 그 외에 rotary Evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, pH meter, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

2-4. 추출, 분획 및 분리

(1) 추출 및 분획

채집한 파배기 모자반 (*Sargassum siliquastrum*)은 사용하기 전에 $-25\text{ }^\circ\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다가 해빙 후, acetone과 methylene chloride를 1:1 비율로 섞은 혼합용액을 사용하여 24시간 방치한 후 여과하였다. 이 과정을 2번 반복하였으며, 얻어진 추출액은 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA

JAPAN, N-N series)로 농축하고 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 통해 추출물을 얻었다 (acetone/methylene chloride 추출물 : 3.36 g; methanol 추출물 : 131.13 g). 두 추출물을 합한 조추출물 57.25 g은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 각각 7.24 g, 8.05 g, 3.02 g, 38.94 g 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from *Sargassum siliquastrum*

(2) 모자반의 활성 성분 분리

모자반의 85% aq. MeOH 분획에 대해 MeOH와 물의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며 50% (rfc 1), 60% (rfc 2), 70% (rfc 3), 80% (rfc 4), 90% aq. MeOH (rfc 5) 과 100% MeOH (rfc 6) 그리고 100% EtOAc (rfc 7) 용매 분획을 얻었다.

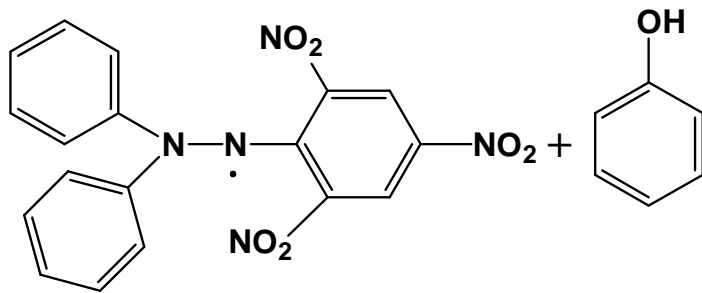
2-5. 항산화 활성 실험

(1) DPPH radical 소거 활성

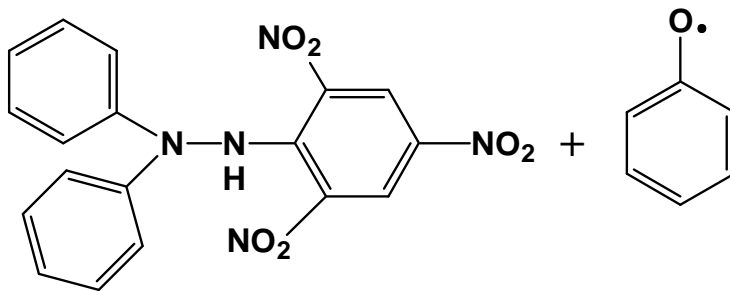
1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 화학적으로 안정한 free radical을 가지는 수용성 물질로써 진한 보라색을 띠며, 518 nm에서 특이적인 흡수 band를 가진다. DPPH에 있는 radical이 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응하여 안정한 분자 diphenylpicrylhydrazine이 되면 본연의 보라색을 잃고 노란색을 띠게 되면서, 518nm에서 강하게 보이는 흡수 띠가 사라지게 된다. 반응에 비례하여 색이 변화하고 흡광도도 감소하게 되므로, 실험 시, 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 알 수 있다 (Fig. 2). 이런 DPPH 소거 작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성 측정에 많이 사용된다.¹¹⁾ 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

먼저 각 농도별 시료 (10~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 MeOH에 녹여 준비한다. DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹여 DPPH 원액을 만든다. 원액 1200 μl 에 DMSO 500 μl 와 EtOH를 3000 μl 를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비한다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 맞춘다. 준비한 시료를 100 μl 와 DPPH 희석액 900 μl 를 섞은 후 UV 값 518 nm에서 10후에 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다(Scheme 3)..

$$\text{EDA (electron donating ability)}(\%) = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



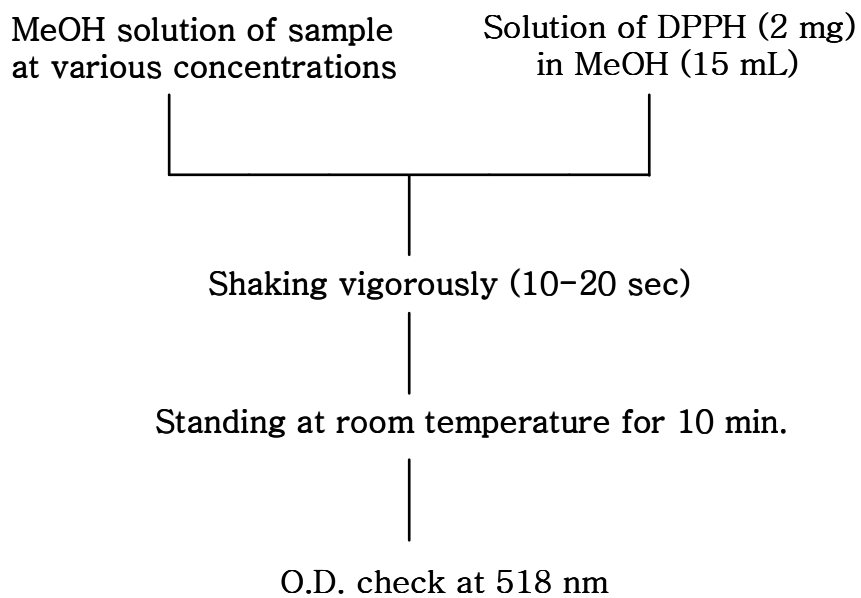
DPPH • (Violet, 518nm)



**Diphenylpicrylhydrazine
(yellow)**

**Phenoxy
radical**

Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol .



Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.

(2) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (Fig. 3). DHR 123 (5 mM)을 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80 °C에 보관하고, DHR 123 (f.c. 5 μM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite 를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 그리고는 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 실온에서 1시간 동안 방치한 후 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR 123의 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 ONOO⁻ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate 로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.¹²⁾(Scheme 4).

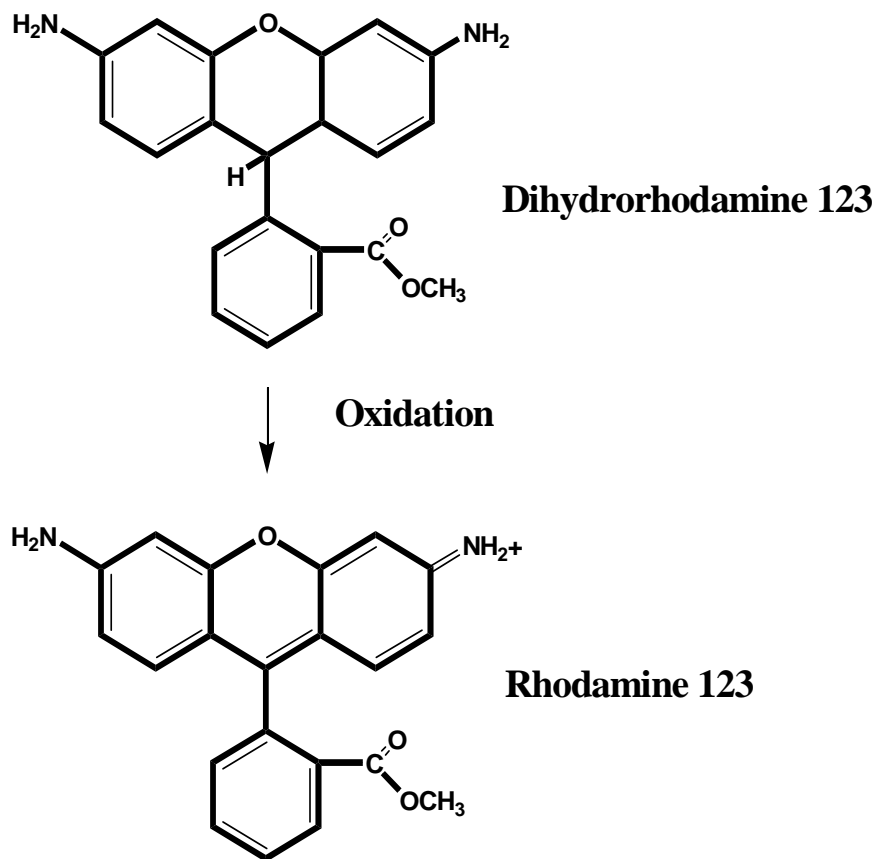


Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO⁻) mediated oxidation of DHR123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37 °C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 525 nm

Scheme 4. Measurement of the ONOO⁻ scavenging effect.

2-6. 세포수준에서 항산화 활성 실험y

(1) 세포배양

사람의 섬유육종 세포인 HT1080세포는 한국 세포 주 은행으로부터 분양받아 배양하여 실험에 사용하였다. HT1080세포는 100 unit/mL penicillin-streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 DMEM 배양액을 사용하여 cell culture dish에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% Trypsin-0.02 % EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

(2) Cell viability의 측정

MTT assay를 이용하여 모자반이 cell viability에 미치는 영향을 확인한다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로써 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazolium bromide] crystal로 환원시킨다. 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm 의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

HT1080 세포를 cell counting 하여 96 well micro-plate에 1×10^5 cells/ml 로 100 μ l 씩 분주하여 37°C, CO₂ incubator 에서 24시간 배양한다. 준비된 농도별 시료를 각 well에 처리하고 24시간 37°C, CO₂ incubator에서 배양한다. 배지를 제거하고 MTT 시약 5 mg을 1 ml PBS로 녹인후, 10% FBS가 함유된 DMEM배지 9 ml와 희석하여 각 well에 100 μ l 씩 처리한다. 3~4시간 동안

incubation하여 formazan 형성을 관찰한다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100 μl 를 넣어서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

(3) ROS (total free radical 측정)

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다¹³⁾ DCFH-DA (fluorescence probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sigma)는 세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. 세포를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS 완충액으로 씻은 후 20 μM DCFH-DA를 각 well에 주입하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μM H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

(3) DNA 산화 생성물의 측정

세포내에서 DNA를 추출하여 0.1 mM H₂O₂와 0.1 M FeSO₄를 이용하여 10분간 Fenton 반응을 시켰을 때의 산화정도를 측정하였다.¹⁴⁾

(4) GSH activity 측정

세포내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobiman)을 이용하여 측정하였다.¹⁵⁾ 세포는 fluorescence microtiter 96-well plates에 well 당 1×10^7 cells/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 M mBBr(monobromobiman)를 처리

하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 ex. 360 nm, em. 465 nm에서 형광 분석기로 측정하였다.

2-7. *in vitro* 항비만 실험

(1) 3T3-L1 세포의 배양 및 지방세포로의 분화 유도

3T3-L1 preadipocytes (ATCC)는 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 unit/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin이 포함된 DMEM배양액을 사용하여 75 T-flask 에서 5% CO₂, humid, 37°C incubator 에서 배양하였다. 3-4일 후 세포가 confluent 하게 되면 0.05% Trysin/EDTA 를 처리하여 세포를 분리하여 원심분리기(1000 rpm, 3분)에서 세포를 모은 후 세포 밀도가 3.3×10^3 cell/cm² 인 suspension 용액을 만들어 12 well plate 에 1 ml씩 plating하여 배양하였다. 2~3 일에 한번씩 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM배양액으로 바꿔주었다. 3~4일 후 세포가 confluent가 된 후 이틀 만에 분화배지 (DMEM 배양액에 5 µg/ml의 insulin, 0.25 µM Dexamethazone, 0.5 mM IBMX가 첨가된 배지)를 처리하여 분화가 시작되게 하였다. 이틀 후 feeding medium (DMEM 배양액에 5 µg/ml의 insulin만 포함된 배지)으로 배지를 갈아 준 후 2일에 한번 씩 계속 feeding medium로 갈아주며 세포를 분화시켰다. 분화배지 처리 후 7일이 되면 90% 이상이 지방세포로 분화하게 되면, sample을 feeding medium에 녹여서 0.2 µm의 filter로 여과한 후 완전히 분화된 지방세포에 처리하였다. 시료처리 후 24시간 이 지난 후 배지를 모아 glycerol 분비량을 측정하였다.

(2) Glycerol 함량의 측정

Glycerol 정량은 효소 반응법을 이용하여 free glycerol reagent (Sigma, USA) 를 반응시켜 측정하였다. 37°C로 pre-warmed된 free glycerol reagent 1 ml에 collect한 배지 10 µl를 넣어 37°C의 water bath에서 5분간 incubation 시켰다. Glycerol을 정량을 위해서는 standard glycerol (Sigma, USA) 12.5 µg, 25 µg을 위와 동일한 방법으로 반응시켰다. 이 모든 과정을 진행시킨 후 96-well에 200 µl 씩 옮겨서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) TG 함량의 측정

TG 측정은 Green and Kehinde¹⁶⁾의 방법을 이용하였다. Trypsin-EDTA 처리로 세포를 수축시킨 다음 원심분리(12,000 rpm, 3 min, 4°C)하여 상층액을 제거하였다. Pellet에 homogenizing buffer (KCl 154 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM)의 비율로 만들어진 triglyceride extraction solution으로 세포 내 triglyceride를 추출하였다. triglyceride의 농도는 TRIGLYZYME-V "EiKen" kit (신양화학, Korea)를 사용하여 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 모자반에서 분리된 화합물들의 구조결정

Compound 1은 이성질체인 compound 2와 함께 무색의 gum 형태로 분리되었으며, 분자식 $C_{27}H_{40}O_4$ 은 질량분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 155 – 110 부근에서 aromatic/olefinic carbon들로 예상되는 12개의 신호가 나타났으며, 1H NMR 스펙트럼에서도 δ 6.40 (1H, d, $j = 2.8$ Hz)과 δ 6.32 (1H, d, $j = 2.8$ Hz)에서 방향족 화합물에서 기인한 신호가 나타났다. 이들은 특이적으로 짝지음 상수 값 2.8 Hz 를 가지는 doublet의 proton 신호로써 일반적인 aromatic proton 신호보다 chemical shift가 고자장으로 이동한 것으로 보아 hydroquinone-type의 부분 구조가 존재한다는 것을 추정할 수 있었다. 방향족 탄소를 제외한 나머지 6개의 탄소 신호(δ 125.63, δ 125.71, δ 135.45, δ 135.61, δ 136.72)는 3개의 이중결합의 존재를 보여주며, 이들을 제외한 나머지 구조는 분자식을 이용한 불포화도 계산을 통해 하나의 고리를 포함하고 있는 것으로 추정되었다.

Compound 1의 전체적인 구조는 1H COSY, TOCSY, NOESY, gHMBC, gHMBC 와 같은 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였다. 정확한 hydroquinone의 부분구조는 aromatic proton인 δ 6.40과 δ 6.32신호와 연관된 gHMBC 실험 데이터를 분석하여 확인되었다. 즉 gHMBC 실험에서 δ 6.40과 δ 6.32의 aromatic protons는 고자장에서 나타난 δ 2.07 (3H, s)의 methyl proton, 그리고 δ 2.68 (2H, t, $J = 6.6$ Hz)의 methylene proton과의 long-range correlation을 통해서 3-alkyl-5-methylhydroquinone 부분구조가 존재함이 증명되었다. 1H COSY 실험에서 δ 2.68의 benzylic methylene protons가 δ 1.74 (2H, m)의 methylene protons와 직접적인 coupling을 하는 것을 관찰함으로써 두 methylene proton들이 바로 인접해 있음을 알 수 있었다. 그리고 gHMBC 스펙트럼 상에서 δ 1.74의 methylene protons을 가지고 있는 탄소(δ 32.78) 신호와 주변 protons와의 사이

에서 long-range coupling이 관찰되고, 또 δ 1.27(3H, s)의 methyl protons가 δ 76.14, δ 32.78, δ 40.56의 탄소 신호와 long-range coupling을 보이는 것으로 보아 chromanol moiety가 존재함을 알 수 있었다. 유사하게 δ 1.56(3H, s)과 δ 1.58(3H, s)의 vinyl methyl proton들이 이웃하는 탄소들 사이에서 관찰되는 long-range correlation, 또 ^1H COSY 실험에서 olefinic proton이 고자장 수소들 사이에서 나타내는 correlation을 분석함으로써 linear prenyl 부분구조가 존재하는 것을 추정할 수 있었으며 C-9'(δ 82.64)와 C-10'(δ 71.31)에 hydroxyl기가 각각 연결되어 있음도 알 수 있었다.

또한 compound 1에 존재하는 C-3', C-7', C-11' 위치의 double bonds의 배열은 고자장으로 이동한 δ 15.95 (C-16'), δ 12.35 (C-15'), δ 18.55 (C-14') 의 vinyl methyl의 탄소 신호와 NOESY 스펙트럼을 종합하여 E 형태로 결정하였으며, 문헌조사를 통해서 compound 1이 *Sagassum siliquastrum*에서 보고된 sargachromanol E 임을 확인할 수 있었다. 이들 결과에 대한 NMR 스펙트럼 데이터를 비교 분석한 결과 문헌치와 잘 일치하였다.⁸⁾

Compound 2는 compound 1과 거의 동일하였으나 compound 1의 C-9'와 C-10'의 asymmetric center에 이웃하여 존재하는 C-7', C-12' 그리고 C-15'의 신호에서 탄소와 수소의 chemical shift가 명확한 차이를 보이며, H-9'와 H-10'의 coupling constant 값 또한 뚜렷한 차이를 보였다(compound 1 : $J_{9',10'} = 8.1$, $J_{10',11'} = 9.3$; compound 2 : $J_{9',10'} = 6.6$, $J_{10',11'} = 8.9$). 이를 통해 compound 1과 2는 C-9'와 C-10'의 자리에 존재하는 hydroxyl 작용기의 배향이 서로 다른 입체 이성질체임을 확인할 수 있었다. 문헌조사 결과, compound 2는 동종의 시료에서 sargachromanol E와 함께 분리된 이성질체인 sargachromanol D 임을 확인할 수 있었다.⁸⁾

Compound 3 는 무색의 gum 형태로 분리되었으며, 고분별능 질량 분석과 ^{13}C NMR에 의해서 분자량이 $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 로 확인 되었다. NMR 스펙트럼 분석 결과 compound 1과 매우 유사한 tetraprenyl chromanol 화합물임을 알 수 있었

다. IR spectrum 측정 결과 $V_{\max} = 1680 \text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 흡수 띠를 보여 주어 carbonyl 작용기가 존재함을 알 수 있었으며, ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 199.01 (C-10') 에서 나타난 신호도 이 사실을 지지 하였다. 그리고 δ 118.67 과 δ 159.64의 탄소 신호와 δ 6.12의 ^1H NMR 신호는 전형적인 α , β -unsaturated ketone의 존재를 나타내었다.

Compound 1과 NMR 스펙트럼을 비교 분석한 결과, compound 3은 compound 1에 존재하던 한 개의 oxymethine(C-10', δ 71.31; H-10', δ 4.25)이 사라지고 δ 199.01에 carbonyl 신호가 나타났으며, C-10' 의 oxymethine 이 ketone 으로 바뀌었음을 확인 할 수 있었다. 최종적으로 compound 3는 *Sagassum siliquatum* 에서 분리되어 보고된 sargachromanol K 임을 확인 할 수 있었으며 분광학적 데이터 역시 문헌치와 잘 일치 하였다.⁸⁾

Compound 4은 무색의 gum 형태로 분리 되었으며, 분자량은 질량 분석과 ^{13}C NMR에 의해서 $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_3$ 로 확인되었다. 이 화합물의 NMR 스펙트럼을 분석한 결과 앞서 분리된 화합물과 유사한 chromanol 계열의 화합물임을 알 수 있었으며, 뚜렷한 차이점으로는 compound 4의 두개의 말단 isoprene 단위에서 compound 1 과 구별되는 탄소 신호가 보여 졌다. 분자식을 이용한 불포화도를 검토해 본 결과 prenyl 위치에 하나의 ring이 존재한다는 것을 추론할 수 있었고, 또한 ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 209.89, 160.14, 140.07에서 나타난 신호와 대응하는 ^1H NMR 스펙트럼에서 나타난 δ 7.15(1H, br, s)의 신호로 판단해 볼 때 하나의 cyclic α , β -unsaturated ketone이 존재함을 알 수 있었다. IR spectrum 의 $V_{\max} = 1690 \text{ cm}^{-1}$ 에서 관측된 강한 흡수 피크와 UV 스펙트럼의 224nm에서 보여진 최대흡수 피크 또한 이 해석을 지지하였다.

말단에 존재하는 두개의 isoprene 단위에 대한 정확한 구조는 2D NMR을 이용하여 결정하였다. H-5' (δ 2.12), H-6' (δ 2.64), H-10' (δ 2.82) 그리고 H-11' (δ 4.86) 의 수소 신호는 ^1H COSY와 TOCSY를 이용하여 linear한 배열로 연결 되어 있음을 알 수 있었으며, cyclic α , β -unsaturated ketone[C-7' (δ 160.14), C-8'

(δ 140.07) 그리고 C-9' (δ 209.89)] 을 이루고 있는 H-7' 신호 또한 위 실험을 통하여 H-6'(δ 2.64)와 연결되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 H-10'(δ 2.82)와 C-10'(δ 52.29)의 chemical shift 값을 통해서 이들이 cyclic α,β -unsaturated ketone과 연결 되어 있을 것으로 추정되었으며, gHMBC 실험에서 이 탄소(C-10') 및 수소(H-10')와 말단 isobutylene group과의 long-range correlation을 통해서 cyclopentenone의 5번 위치에 isobutylene이 존재함이 증명되었다. 문헌조사 결과 sargachromanol P로 분리되어 보고된 화합물로서 NMR 데이터 비교시 문헌치와 잘 일치 하였다.⁸⁾

Compound 5은 compound 6와 함께 yellow gum의 형태인 이성질체로 분리되었으며, HRFAB 질량 분석과 ^{13}C NMR에 의해서 분자식 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$ 을 얻을 수 있었다. 이 화합물의 NMR 데이터는 compound 1의 것과 매우 유사하여 chromanol 계열의 화합물임을 알 수 있었다. Compound 1의 ^{13}C NMR 데이터와 비교한 결과, compound 1에서 나타났던 C-3'(δ 125.71)와 C-4'(δ 135.61)의 신호가 사라지고 δ 43.08에서 methylene 탄소 신호와 δ 73.15 의 quaternary 탄소 신호가 나타남을 확인할 수 있었다. ^1H NMR 스펙트럼에서도 유사한 변화가 관찰되어 compound 1의 δ 5.14 (1H, t, 6.7)에 나타났던 신호가 사라지고 고자장 영역에 새로운 신호들이 관찰되었다. 이러한 변화는 compound 1의 3' 이중결합을 수화(hydration)시킴으로써 설명이 가능하였다. ^1H COSY, gHMQC, gHMBC와 같은 2D 실험을 통하여 hydroxyl의 위치는 C-4'번으로 확인되었다. 이와 같이 이 화합물의 구조는 13-(6-hydroxy-2,8-dimethylchroman-2-yl)-2,6,10-trimethyltrideca-2,6-diene-4,5,10-triol로 결정되었다. Compound 3은 tetraprenyl chromanol 화합물로서 *Sargassum siliquastrum* 에서 처음으로 분리된 신규의 화합물이다.

Compound 6는 compound 3의 C-9'와 C-10' asymmetric center에서 다른 stereochemistry를 가지는 입체이성체이다. Compounds 5과 6는 전형적인 chromanol의 asymmetric center 외에도 linear prenyl part에서 3개의 asymmetric center들을 가지며 그중 C-9' 와 C-10' 에 stereochemistry는 구조적으로 비슷한 유사한 화합물들인 compounds 1과 2의 NMR 데이터

를 비교하여 결정하였다.

인접한 곳에 존재하는 hydroxyl 작용기는 반자기성 효과로 그 주변의 ^1H 와 ^{13}C 의 chemical shift 와 coupling constant 값이 현저한 차이를 보이며 이는 문헌조사 결과 이성질체로 분리된 sargachromanol E 와 sargachromanol D 의 NMR 데이터 분석으로 명확히 알 수 있었다. 이를 바탕으로 두 화합물을 문헌치와 비교 분석 하였다. 분석 결과 ^1H NMR 스펙트럼에서 sargachromanol E (compound 1)의 H-9', -10', -11', -15'의 신호[δ 3.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.22 (1H, dd, $J = 9.3, 7.8$ Hz), 5.03 (1H, br d, $J = 9.3$ Hz), 1.57 (3H, s)]가 compound 5의 H-9', -10', -11', -15' 신호[δ 3.73 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 4.22 (1H, dd, $J = 9.3, 8.0$ Hz), 5.04 (1H, br d, $J = 9.3$ Hz), 1.57 (3H, s)]와 거의 동일한 chemical shift 와 coupling constant 값을 가지는 것을 확인되었다. Compound 6 역시 C-9', -10', -11', -15'의 신호[δ 3.86 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 4.31 (1H, dd, $J = 8.9, 6.8$ Hz), 5.18 (1H, dq, $J = 8.9, 1.5$ Hz), 1.67 (3H, s)]가 sargachromanol D의 동일한 위치의 신호[δ 3.86 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 4.30 (1H, dd, $J = 8.8, 6.6$ Hz), 5.18 (1H, dq, $J = 8.8, 1.5$ Hz), 1.65 (3H, s)]와 거의 동일함이 확인되었다.

따라서 compound 5은 sargachromanol E 와 동일한 stereochemistry인 9S, 10R 을 가지며, compound 6는 sargachromanol D 와 동일한 9S, 10S를 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 C'-4의 stereochemistry는 결정하지 못하였다.

Compound 7 은 무색 gum의 형태로 분리 되었으며, 분자량 결정은 고분해능 질량 분석과 ^{13}C NMR에 의해서 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$ 로 확인되었다. Compound 7은 앞서 분리된 화합물들과 유사한 형태를 보이나 분자량과 ^{13}C NMR 데이터를 분석을 통해서 isoprene 단위가 하나 부족한 chromanol 화합물임을 알 수 있었다. IR spectrum에서는 $V_{\max} = 1680$ cm^{-1} 에서 강한 흡수띠를 보였고 3400-2500 cm^{-1} 에서 broad 한 흡수띠가 나타나 carboxylic acid 작용기가 존재하는 것으로 추정되었으며 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 δ 181.19의 탄소신호 또한 이 사실을 지지하였다. 가장 큰 차이를 보였던 linear prenyl part에 대해서는 ^1H COSY

와 TOCSY 실험을 통해서 H-5', H-6', H-7', H-8'이 linear 형태로 연결되어 있음을 확인하였으며 carboxylic acid 작용기는 gHMBC 실험을 통하여 C-8'에 연결되어 있음이 확인되었다. 이와 같이 이 화합물의 구조는 9-(6-hydroxy-2,8-dimethyl-chroman-2-yl)-2,6-dimethyl-non-6-enoic acid로 결정 되었다. 이 화합물은 *Sargassum siliquastrum*에서 처음 분리되는 물질이다.

Table 1. ¹H NMR spectral data for compound 1-2

position	1 ^a	2 ^b
2		
3	1.74 (2H, m)	1.79 (1H, m), 1.71 (1H, m)
4	2.68 (2H, t, 6.6)	2.73 (2H, t, 6.7)
4a		
5	6.40 (1H, d, 2.8)	6.41 (1H, d, 2.5)
6		
7	6.32 (1H, d, 2.8)	6.51 (1H, d, 2.5)
8		
8a		
1'	1.61 (1H, m) ; 1.52 (1H, m)	1.60 (2H, m)
2'	2.13 (2H, m)	2.09 (2H, m)
3'	5.15 (1H, t, 6.7)	5.17 (1H, t, 6.5)
4'		
5'	1.98 (2H, t, 6.6)	2.01 (2H, t, 7.4)
6'	2.08 (2H, m)	2.17(2H, m)
7'	5.36 (1H, t 6.3)	5.50 (1H, t, 6.9)
8'		
9'	3.72 (1H, d, 8.1)	3.91 (1H, d, 6.6)
10'	4.25 (1H, d, 9.3, 8.1)	4.33 (1H, dd, 8.9, 6.6)
11'	5.04 (1H, br d 9.3)	5.17 (1H, t , 8.9)
12'		
13'	1.67 (3H, d 1.0)	1.77 (3H, s)
14'	1.69 (3H, d 1.0)	1.73 (3H, s)
15'	1.56 (3H, s)	1.65 (3H, s)
16'	1.58 (3H, s)	1.58 (3H, s)
17'	1.27 (3H, s)	1.30 (3H, s)
18'	2.07 (3H, s)	2.12 (3H, s)

^{a,b} Measured in CD₃OD and CDCl₃ at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 2. ^{13}C NMR spectral data for compound 1-2

position	1 ^a	2 ^b
2	76.14 s	75.25 d
3	32.78 t	31.42 t
4	23.48 t	22.53 t
4a	122.13 s	121.10 s
5	113.47 d	112.51 d
6	150.15 s	147.65 s
7	116.48 s	115.56 d
8	127.59 s	127.19 s
8a	146.16 s	145.75 s
1'	40.56 t	39.56 t
2'	23.26 t	22.21 t
3'	125.71 d	124.72 d
4'	135.61 s	134.53 s
5'	40.34 t	39.18 t
6'	27.21 t	26.13 t
7'	129.28 d	129.46 d
8'	135.45 s	133.45 s
9'	82.64 d	80.20 d
10'	71.31 d	69.21 d
11'	125.63 d	123.30 d
12'	136.72 s	139.13 s
13'	26.15 q	26.13 q
14'	18.55 q	18.71 q
15'	12.35 q	11.92 q
16'	15.95 q	15.83 q
17'	24.46 q	24.11 q
18'	16.42 s	16.42 s

^{a,b} Measured in CD_3OD and CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 3

position	^1H	^{13}C
2		75.24 s
3	1.79 (1H, dt, 13.7, 6.8); 1.73 (1H, dt, 13.7, 6.8)	31.47 t
4	2.69 (2H, t, 6.8)	22.55 t
4a		121.12 s
5	6.36 (1H, d, 3.0)	112.49 d
6		147.64 s
7	6.46 (1H, d, 3.0)	115.55 d
8		127.23 s
8a		145.78 s
1'	1.64 (1H, dt, 15.1, 7.1); 1.54 (1H, dt, 15.1, 8.3)	39.70 t
2'	2.13 (2H, m)	22.26 t
3'	5.15 (1H, t, 6.5)	124.67 d
4'		134.45 s
5'	2.05 (2H, t, 7.3)	39.03 t
6'	2.18 (2H, m)	26.65 t
7'	5.59 (1H, t, 6.9)	132.47 d
8'		132.64 s
9'	4.41 (1H, d, 4.1)	83.35 d
10'		199.06 s
11'	6.12 (1H, br s)	118.67 d
12'		159.64 s
13'	1.91 (3H, s)	28.13 q
14'	2.21 (3H, s)	21.40 q
15'	1.41 (3H, s)	10.87 q
16'	1.61 (3H, s)	15.92 q
17'	1.26 (3H, s)	24.01 q
18'	2.12 (3H, s)	16.16 s

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 4

position	^1H	^{13}C
2		75.15 s
3	1.78 (2H, m)	31.46 t
4	2.70 (2H, m)	22.53 t
4a		121.06 s
5	6.40 (1H, d, 2.8)	112.52 d
6		147.65 s
7	6.32 (1H, d, 2.8)	115.58 d
8		127.22 s
8a		145.76 s
1'	1.62 (1H, m) ; 1.53 (1H, m)	39.60 t
2'	2.12 (2H, m)	22.28 t
3'	5.18 (1H, t, 6.7)	126.83 d
4'		132.64 s
5'	2.12 (2H, m)	44.60 t
6'	2.64 (1H, m)	45.48 t
7'	7.15 (1H, br, s)	160.14 d
8'		140.07 s
9'		209.89 s
10'	2.82 (1H, dd, 9.4, 2.2)	52.29 d
11'	4.86 (1H, br d 9.6)	121.30 d
12'		135.93 s
13'	1.64 (3H, d 1.1)	18.44 q
14'	1.74 (3H, d 1.1)	25.92 q
15'	1.75 (3H, s)	10.51 q
16'	1.59 (3H, s)	16.15 q
17'	1.26 (3H, s)	24.06 q
18'	2.12 (3H, s)	16.15 d

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMBC, and gHMBC experiments.

Table 5. ¹H NMR spectral data for compound 5-6

position	5 ^a	6 ^b
2		
3	1.75 (2H, m)	1.77 (2H, m)
4	2.67 (2H, t, 6.7)	2.67 (2H, t, 6.7)
4a		
5	6.30 (1H, d, 2.5)	6.30 (1H, d, 2.5)
6		
7	6.38 (1H, d, 2.5)	6.38 (1H, d, 2.5)
8		
8a		
1'	1.53 (2H, m)	1.54 (2H, m)
2'	1.47 (2H, m)	1.48 (2H, m)
3'	1.45 (2H, m)	1.47 (2H, m)
4'		
5'	1.44 (2H, m)	1.49 (2H, m)
6'	2.01 (2H, q, 7.2)	2.07 (2H, q, 7.0)
7'	5.35 (1H, t, 7.2)	5.40 (1H, t, 7.0)
8'		
9'	3.73 (1H, d, 8.0)	3.83 (1H, d, 6.1)
10'	4.22 (1H, dd, 9.3, 8.0)	4.27 (1H, dd, 8.9, 6.2)
11'	5.04 (1H, br d, 9.3)	5.22 (1H, dt, 8.9, 1.5)
12'		
13'	1.68 (3H, d, 1.5)	1.74 (3H, d, 1.1)
14'	1.66 (3H, d, 1.5)	1.69 (3H, d, 1.1)
15'	1.57 (3H, s)	1.64 (3H, s)
16'	1.14 (3H, s)	1.15 (3H, s)
17'	1.24 (3H, s)	1.24 (3H, s)
18'	2.06 (3H, s)	2.06 (3H, s)

^{a,b} Measured in CD₃OD and CDCl₃ at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMBC, and gHMBC experiments.

Table 6. ^{13}C NMR spectral data for compound 5-6

position	5 ^a	6 ^b
2	76.29 s	76.28 s
3	32.69 t	32.69 t
4	23.50 t	23.47 t
4a	122.12 s	122.09 s
5	113.43 d	113.37 d
6	150.12 s	150.09 s
7	116.46 d	116.41 d
8	127.59 s	127.57 s
8a	146.15 s	146.12 s
1'	41.12 t	41.13 t
2'	19.20 t	19.15 t
3'	43.08 t	43.13 t
4'	73.15 s	73.19 s
5'	42.02 t	42.05 t
6'	23.29 t	23.37 t
7'	129.65 d	129.12 d
8'	135.39 s	135.56 s
9'	82.64 d	81.53 d
10'	71.30 d	71.30 d
11'	125.67 d	125.88 d
12'	136.60 s	137.03 s
13'	26.15 q	26.20 q
14'	18.58 q	18.60 q
15'	12.27 q	12.40 q
16'	27.00 q	26.90 q
17'	24.63 q	24.57 q
18'	16.49 q	16.44 q

^{a,b} Measured in CD₃OD and CDCl₃ at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ¹H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMBC, and gHMBC experiments.

Table 7. Comparison of NMR spectral data for compound 5 with those for sargachromanol E

position	compound 5		sargachromanol E	
	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
6'	2.01 (2H, dt, 6.6, 7.2)	23.3 t	2.08 (2H, dt, 6.8, 7.3)	27.2 t
7'	5.35 (1H, t, 6.6)	129.7 d	5.34 (1H, t, 6.8)	129.4 d
8'		135.4 s		135.6 s
9'	3.73 (1H, d, 8.0)	82.6 d	3.71 (1H, d, 7.8)	82.7 d
10'	4.22 (1H, dd, 9.3, 8.0)	71.3 d	4.22 (1H, dd, 9.3, 7.8)	71.4 d
11'	5.04 (1H, br d, 9.3)	125.7 d	5.03 (1H, br d, 9.3)	125.8 d
12'		136.6 s		136.9 s
13'	1.68 (3H, d, 1.0)	26.2 q	1.67 (3H, d, 1.0)	26.1 q
14'	1.66 (3H, d, 1.0)	18.6 q	1.66 (3H, d, 1.0)	18.5 q
15'	1.57 (3H, s)	12.3 q	1.57 (3H, s)	12.3 q

Measured in CD₃OD at 300 and 75 MHz, respectively.

Table 8. Comparison of NMR spectral data for compound 6 with those for sargachromanol D

No	compound 6		sargachromanol D	
	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
6'	2.13 (2H, q, 7.8)	22.6 t	2.16 (2H, m)	26.0 t
7'	5.50 (1H, t, 6.9)	129.7 d	5.46 (1H, t, 7.3)	129.5 d
8'		133.2 s		133.5 s
9'	3.86 (1H, d, 6.8)	80.1 d	3.86 (1H, d, 6.6)	80.2 d
10'	4.31 (1H, dd, 8.9, 6.8)	69.3 d	4.30 (1H, dd, 8.8, 6.6)	69.2 d
11'	5.18 (1H, dq, 8.9, 1.5)	123.4 d	5.19 (1H, dq, 8.8, 1.5)	123.3 d
12'		139.2 s		139.2 s
13'	1.77 (3H, s)	26.2 q	1.77 (3H, s)	26.0 q
14'	1.73 (3H, s)	18.7 q	1.73 (3H, s)	18.6 q
15'	1.67 (3H, s)	11.9 q	1.65 (3H, s)	11.8 q

Measured in CDCl₃ at 300 and 75 MHz, respectively.

Table 9. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 7.

position	^1H	^{13}C
2		75.29 s
3	1.77 (2H, m)	31.44 t
4	2.69 (2H, t, 6.7)	22.56 t
4a		121.15 s
5	6.36 (1H, d, 3.0)	112.51 d
6		147.55 s
7	6.46 (1H, d, 3.0)	115.55 d
8		127.26 s
8a		145.85 s
1'	1.60 (2H, m)	39.65 t
2'	2.09 (2H, q, 8.0)	22.22 t
3'	5.11 (1H, tq, 7.0, 1.4)	124.53 d
4'		134.58 s
5'	1.96 (2H, t, 7.0)	39.43 t
6'	1.42 (2H, m)	25.39 t
7'	1.63 (2H, m)	33.15 t
8'	2.46 (1H, m)	39.08 d
9'		181.19 s
10'	1.17 (3H, d, 6.9)	10.48 q
11'	1.57 (3H, s)	15.78 q
12'	1.25 (3H, s)	24.13 q
13'	2.13 (3H, s)	16.16 q

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

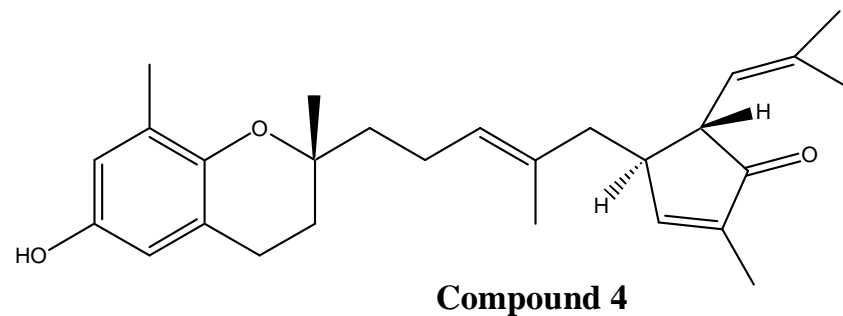
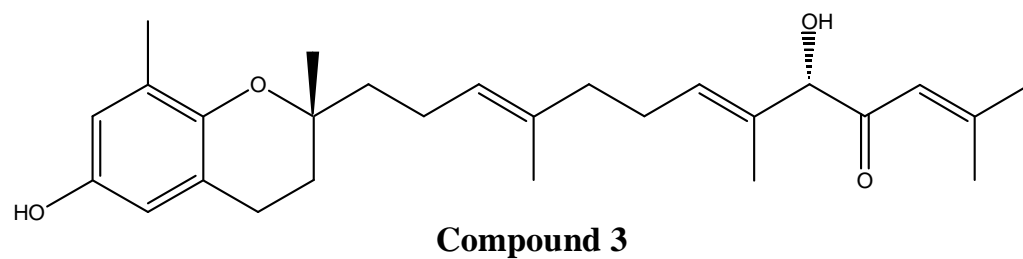
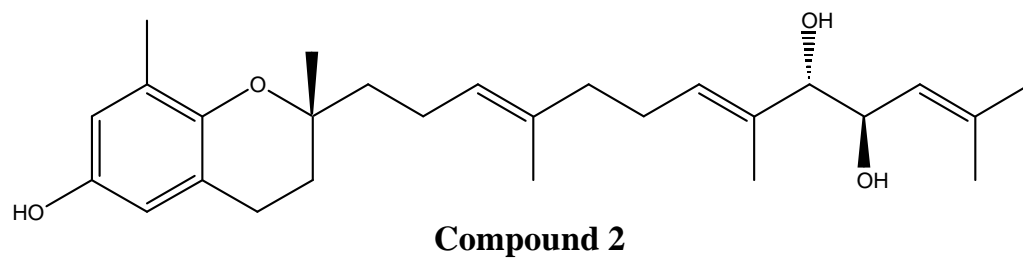
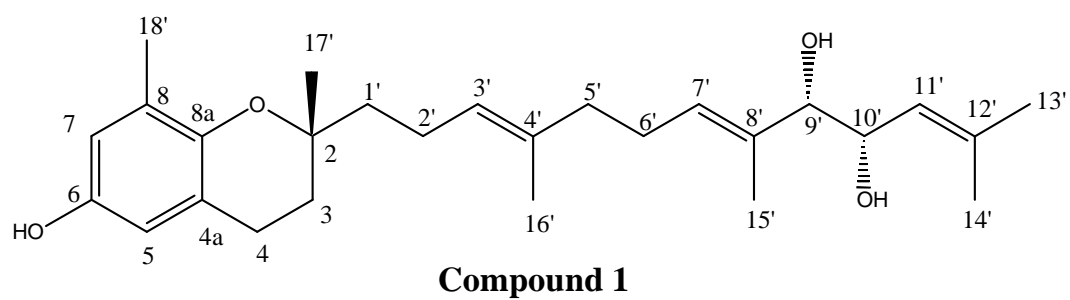


Fig. 4 Chemical structure of compounds 1-4 from *Sargassum siliquastrum*

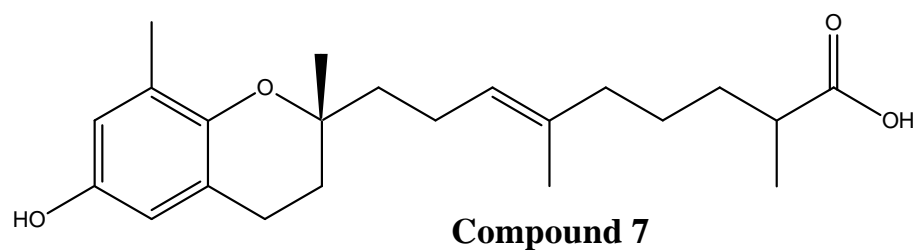
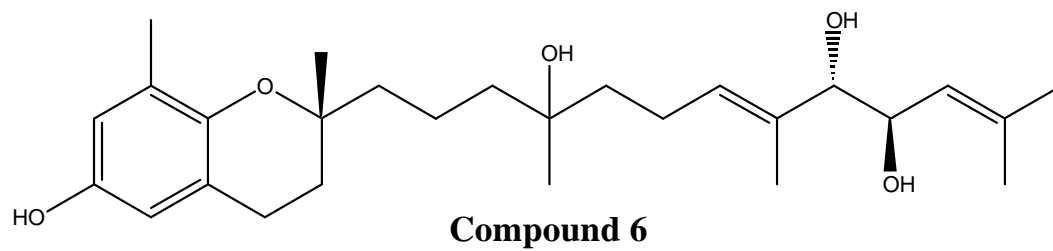
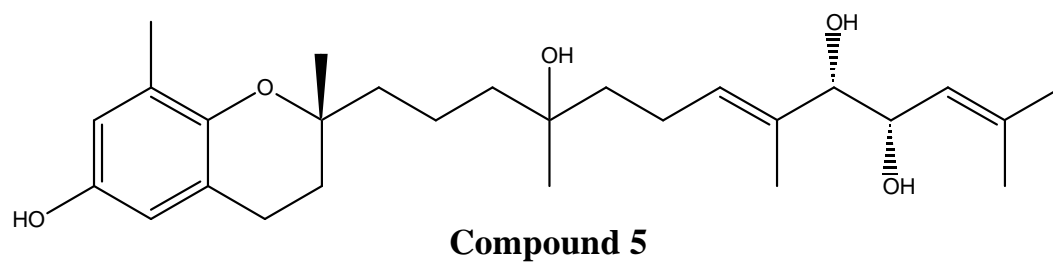


Fig. 5 Chemical structure of compounds 5-7 from *Sargassum siliquastrum*

Compound **1** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: + 9.52 ° (*c* 0.21, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1645, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1 and 2, respectively; LRFABMS m/z 451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound **2** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: + 8.57 ° (*c* 0.23, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1 and 2, respectively; LRFABMS m/z 451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Compound **3** : colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$: + 16.67 ° (*c* 0.12, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2930, 1680, 1620, 1470, 1220 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 237 (3.77) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 3 ; LREIMS m/z 426 $[\text{M}]^+$

Compound **4** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: + 12.27 ° (*c* 0.73, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2925, 1690, 1635, 1220 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 224 (3.86) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 4; LRFABMS m/z 431 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Compound **5** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: + 23.33 ° (*c* 0.13, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1645, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 5 and 6, respectively; HRFABMS m/z 446.3066 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$, 446.3032)

Compound **6** : colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$: + 7.50 ° (*c* 0.13, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2975, 2930, 1470, 1375, 1220 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 5 and 6, respectively; HRFABMS m/z 446.3066 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$, 446.3032)

Compound **7** : colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$: + 12.00 ° (*c* 0.17, MeOH); IR (NaCl) : ν_{\max} =3400 - 3300, 2944, 1690, 1635, 1449 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 9; HREIMS m/z 360.2327 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$, 360.2301).

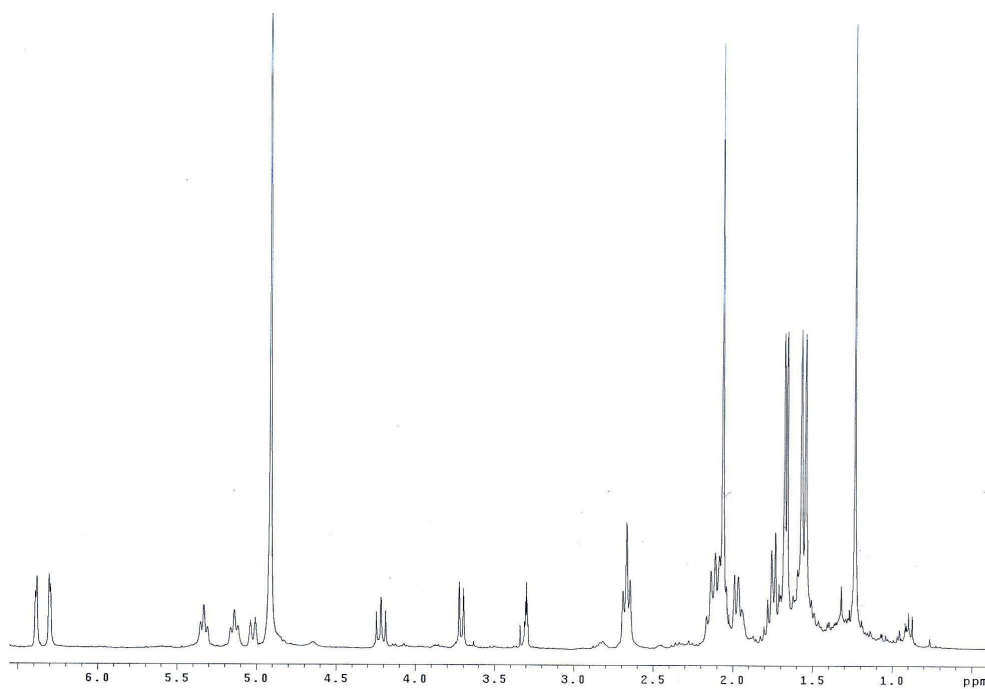


Fig. 6. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

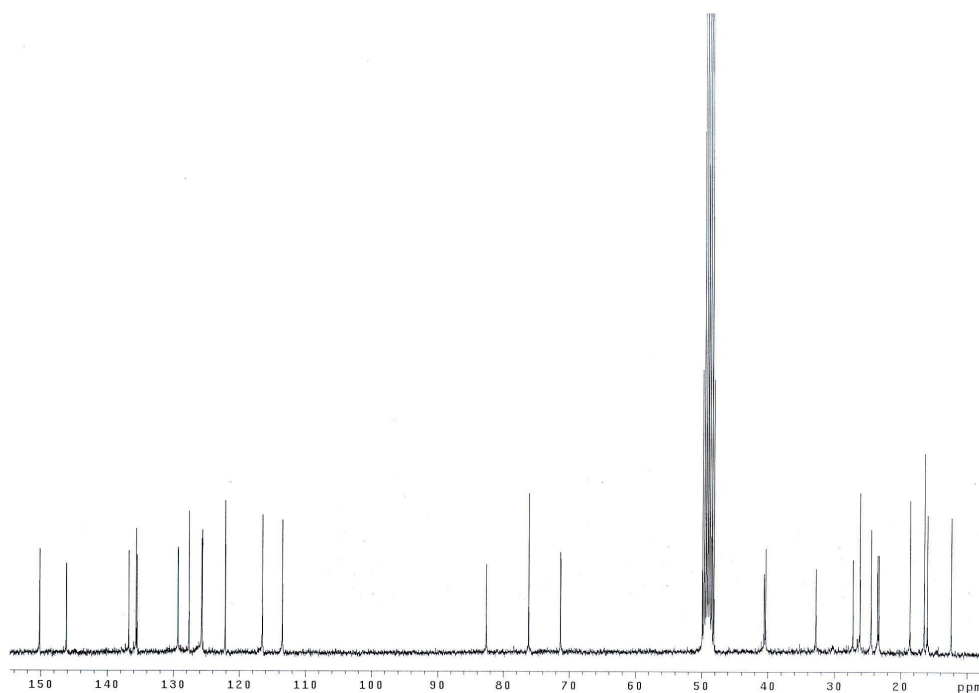


Fig. 7. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

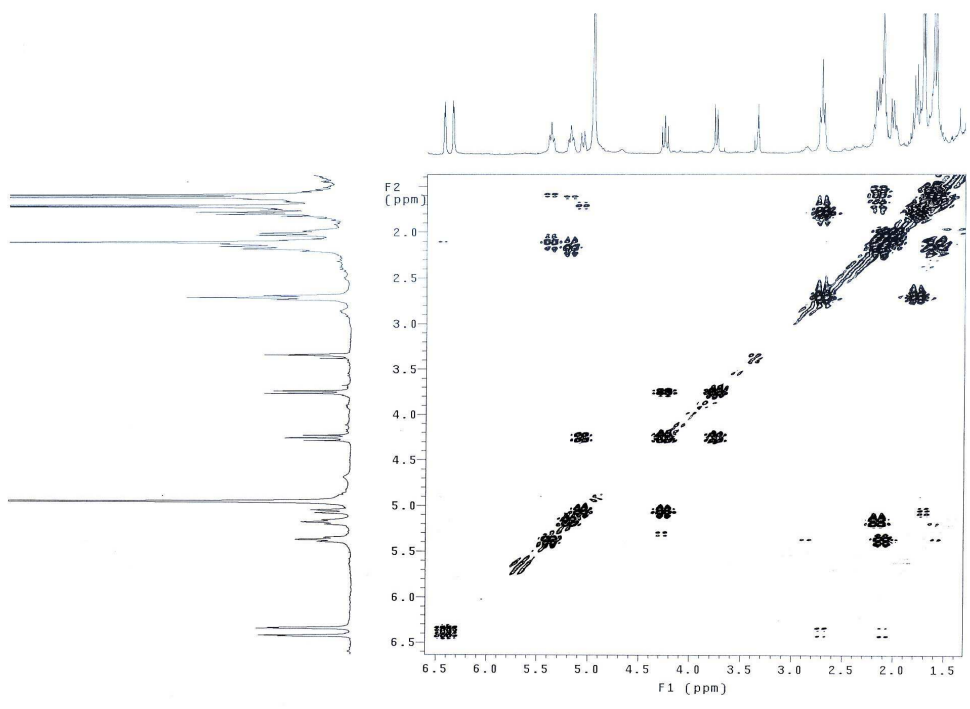


Fig. 8. gDQCOSY spectrum of compound 1 in CD₃OD.

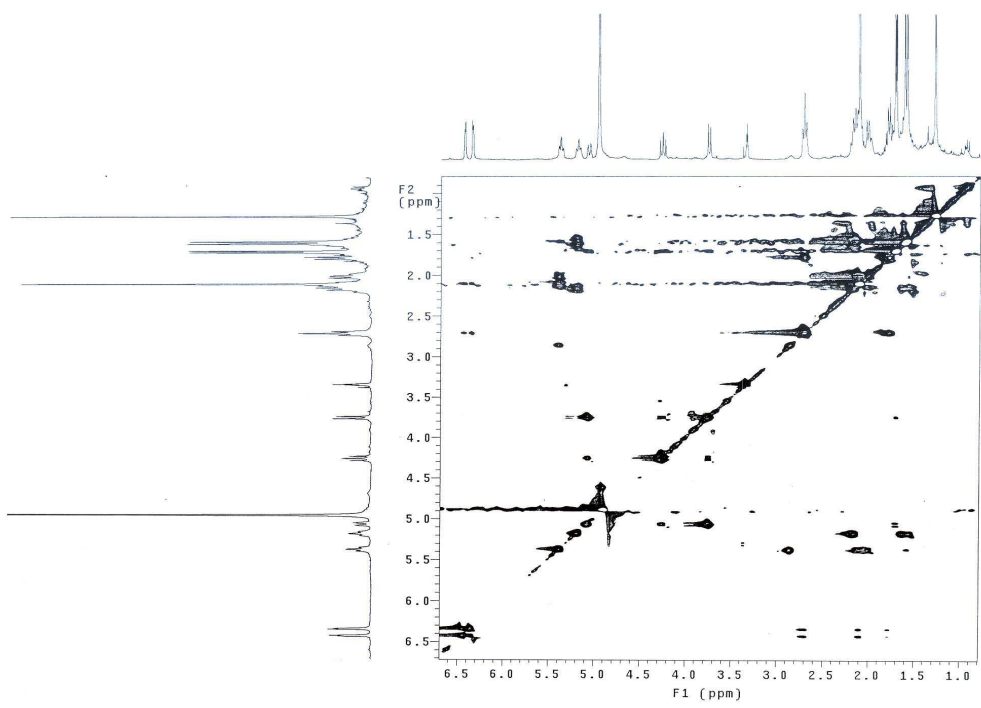


Fig. 9. TOCSY spectrum of compound 1 in CD₃OD.

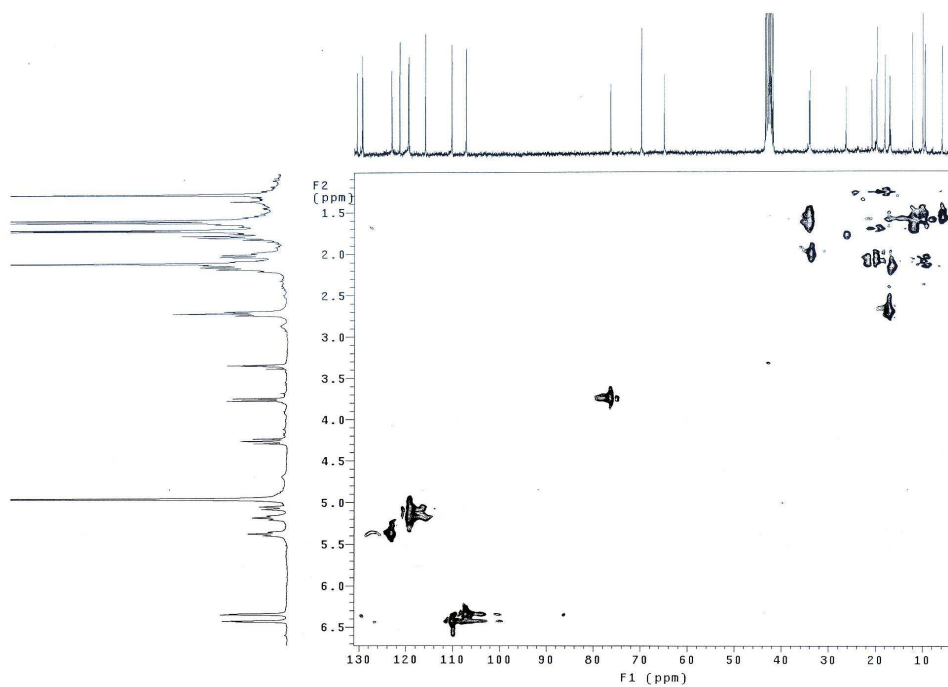


Fig. 10. gHMBC spectrum of compound 1 in CD₃OD.

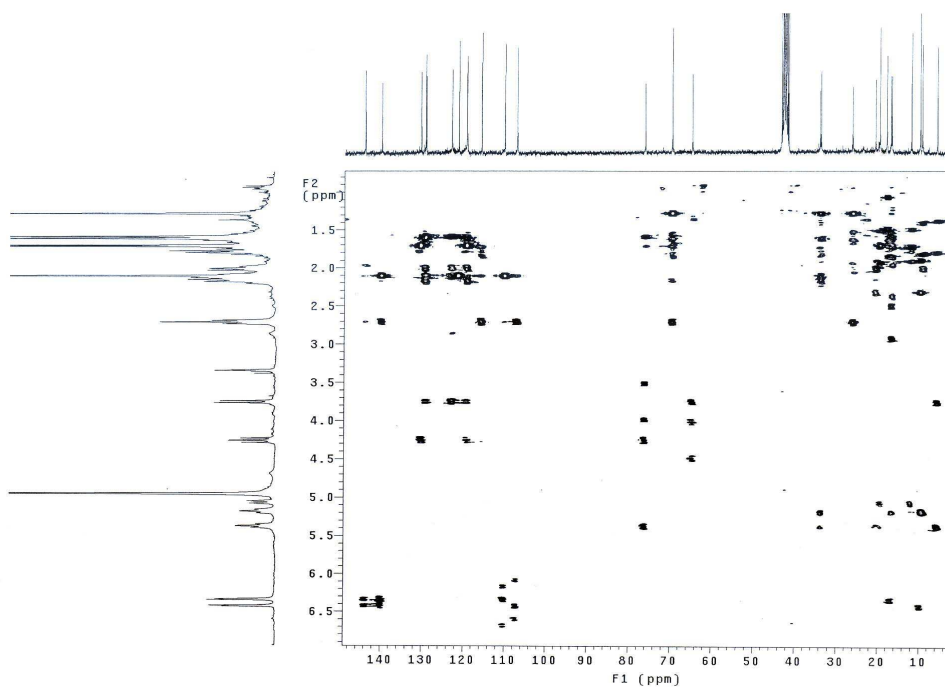


Fig. 11. gHMBC spectrum of compound 1 in CD₃OD.

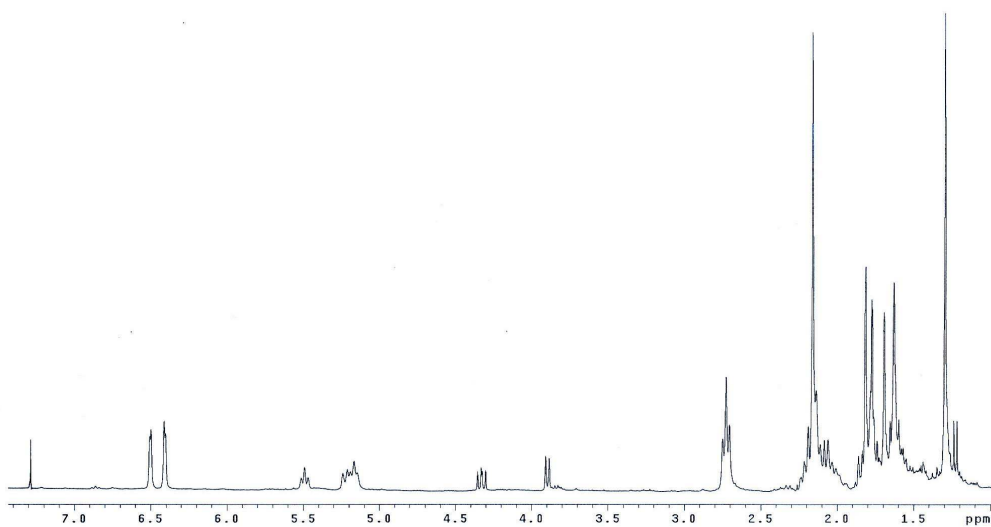


Fig. 12. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

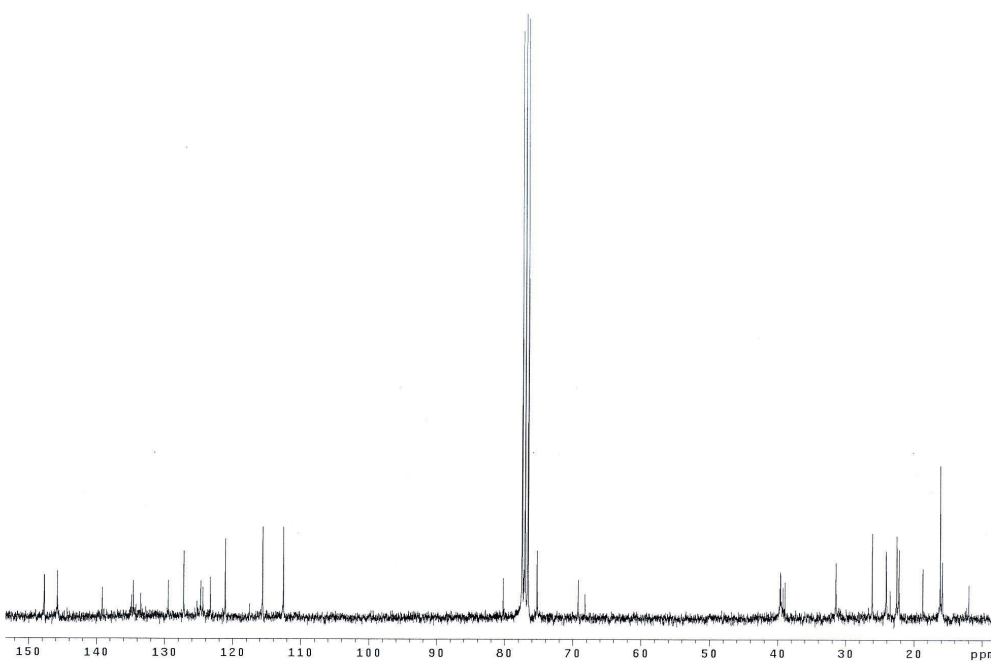


Fig. 13. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

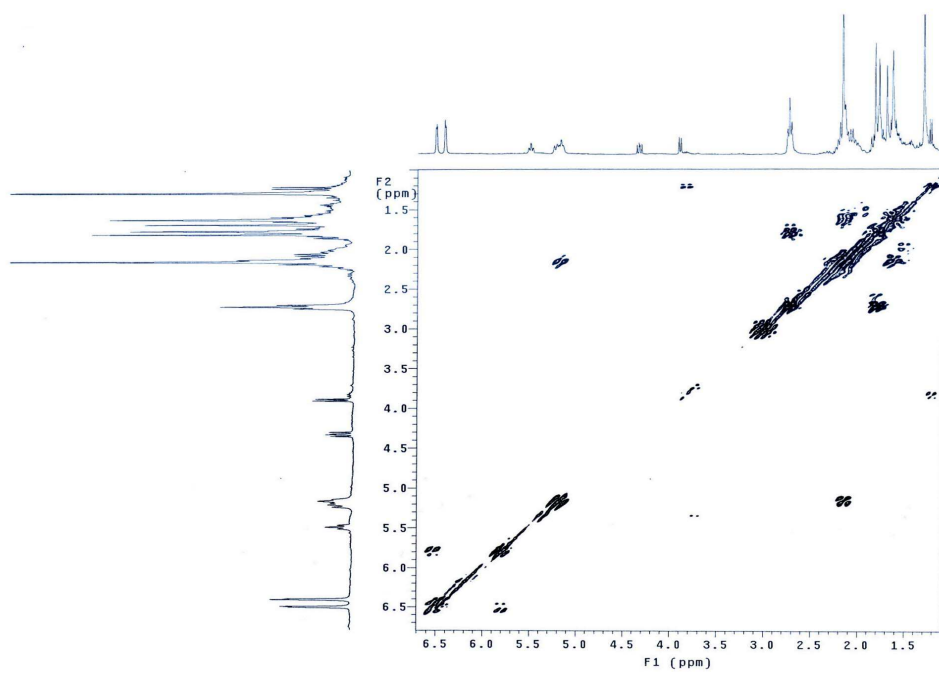


Fig. 14. gDQCOSY spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

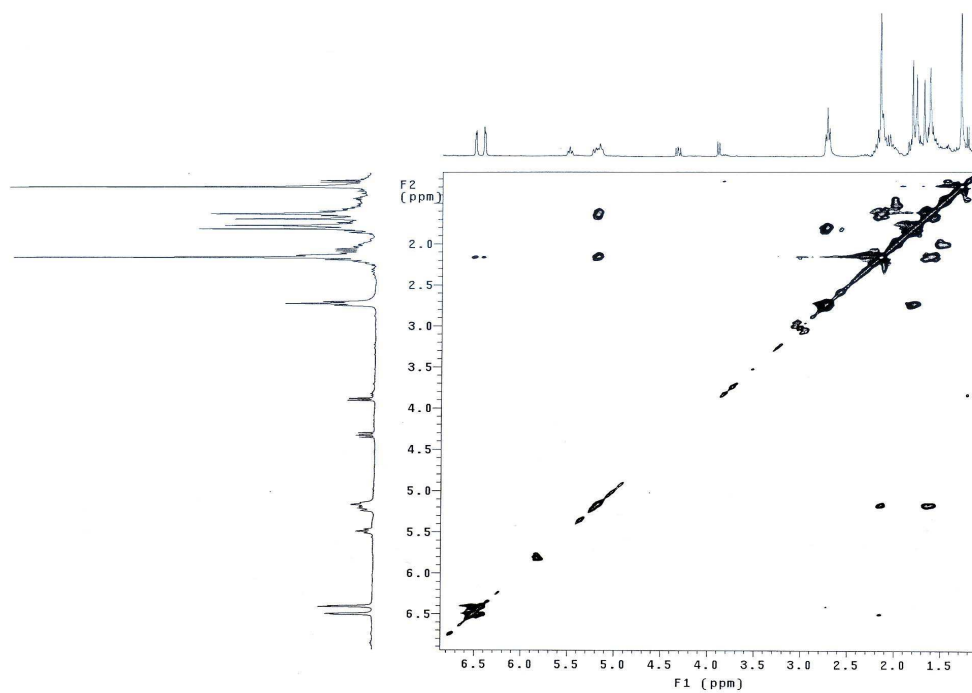


Fig. 15. TOCSY spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

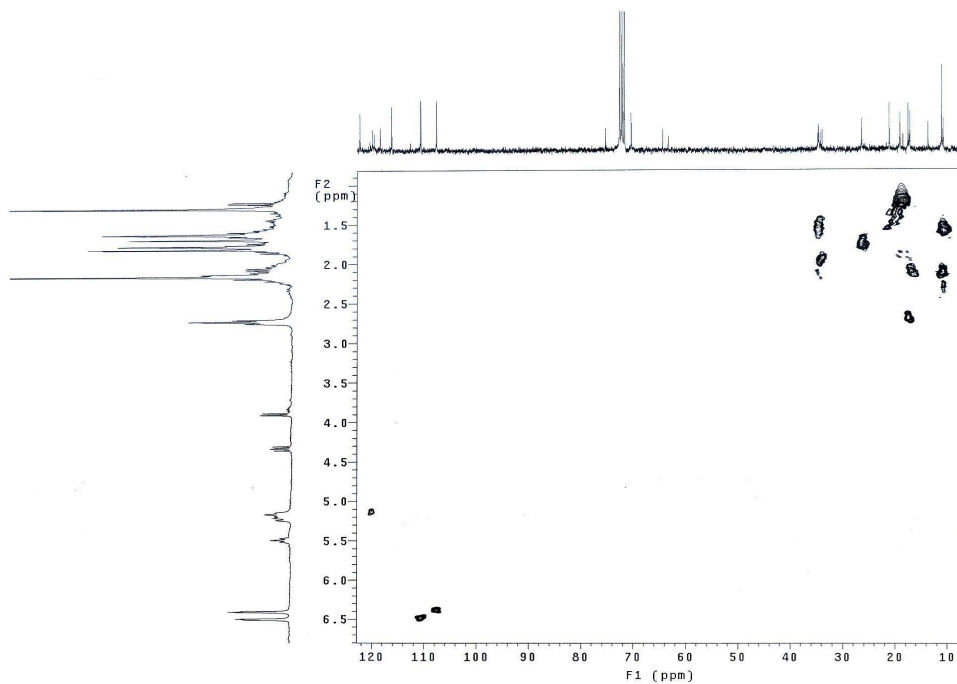


Fig. 16. gHMQC spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

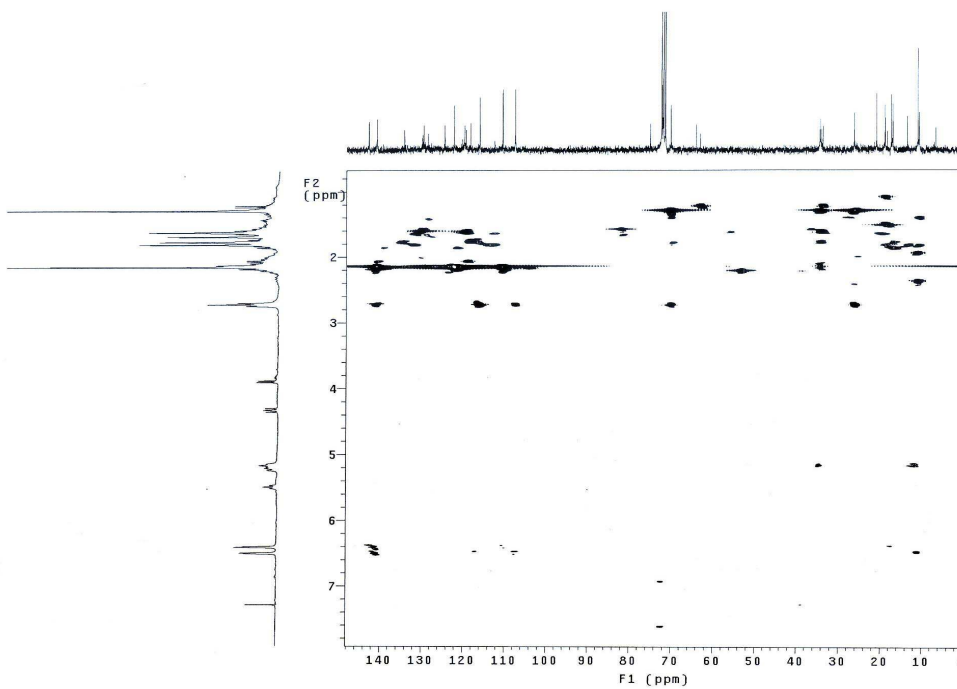


Fig. 17. gHMBC spectrum of compound 2 in CDCl_3 .

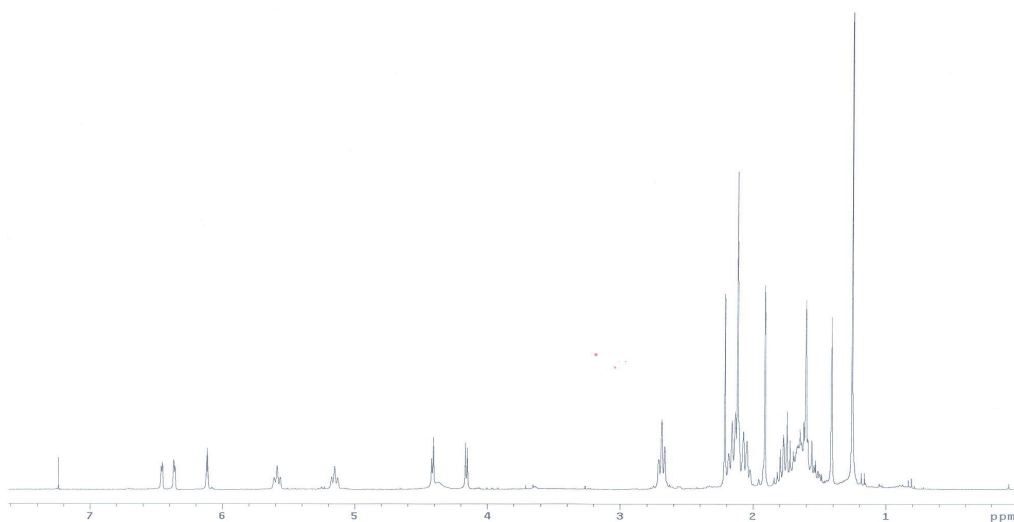


Fig. 18. ^1H NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3

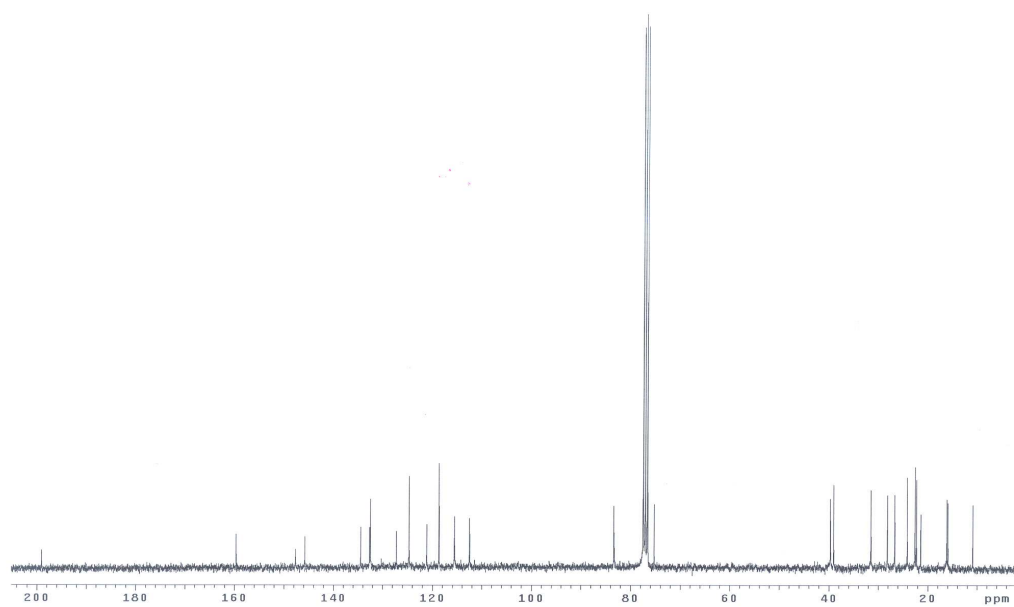


Fig. 19. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3

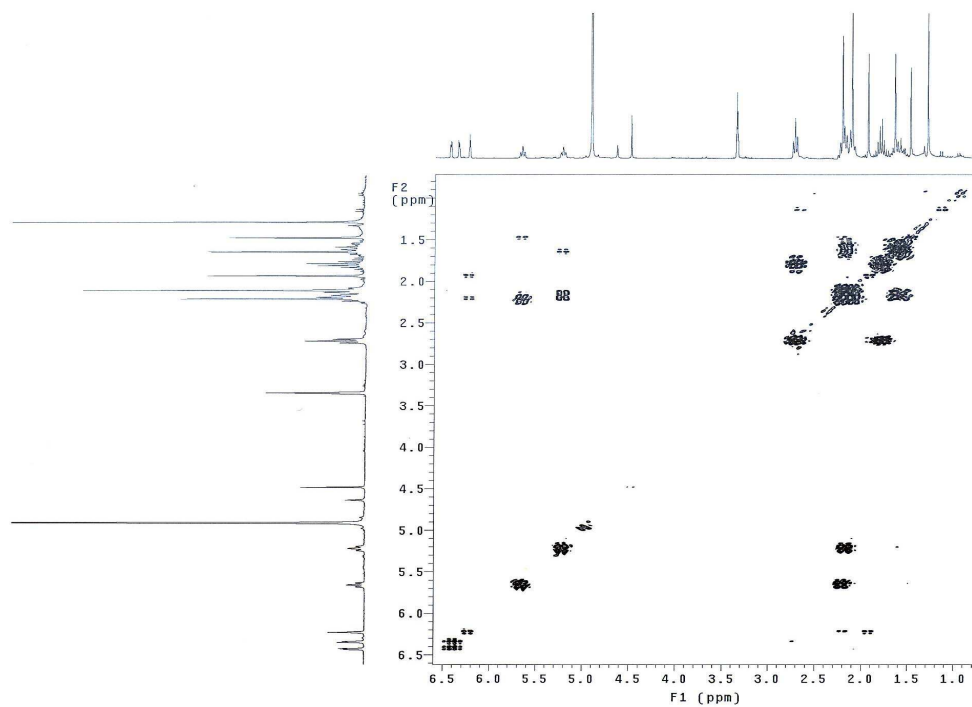


Fig. 20. gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD₃OD.

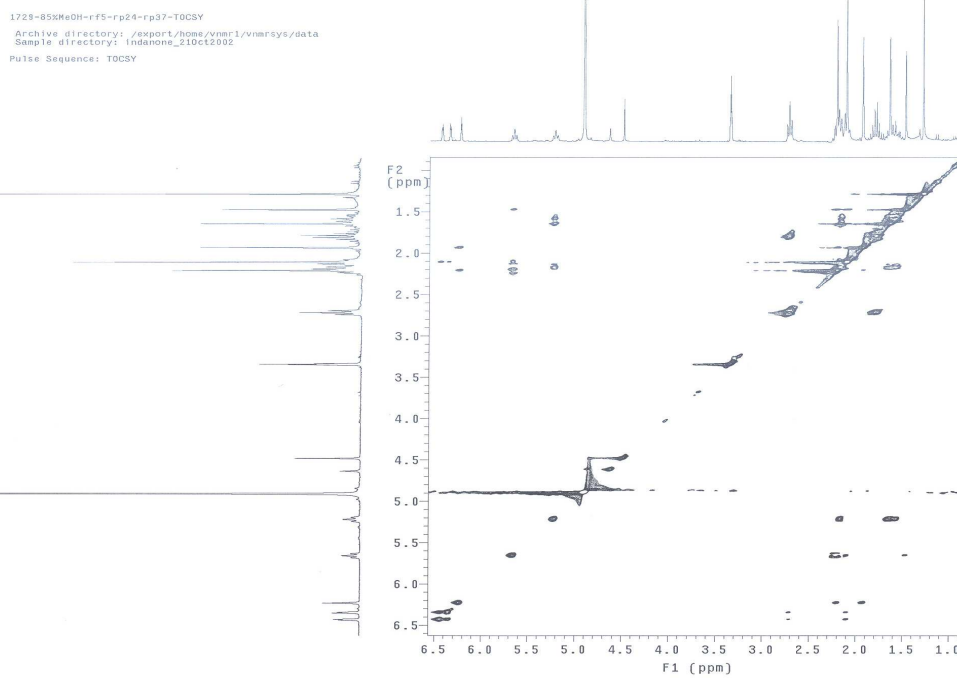


Fig. 21. TOCSY spectrum of compound 3 in CD₃OD

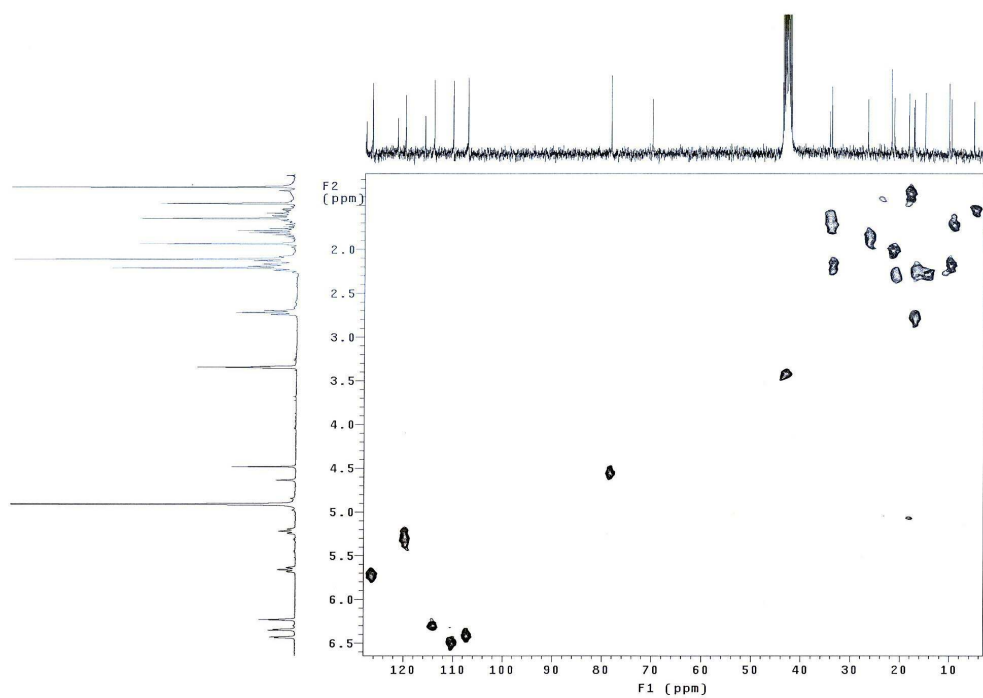


Fig. 22. gHMQC spectrum of compound 3 in CD₃OD

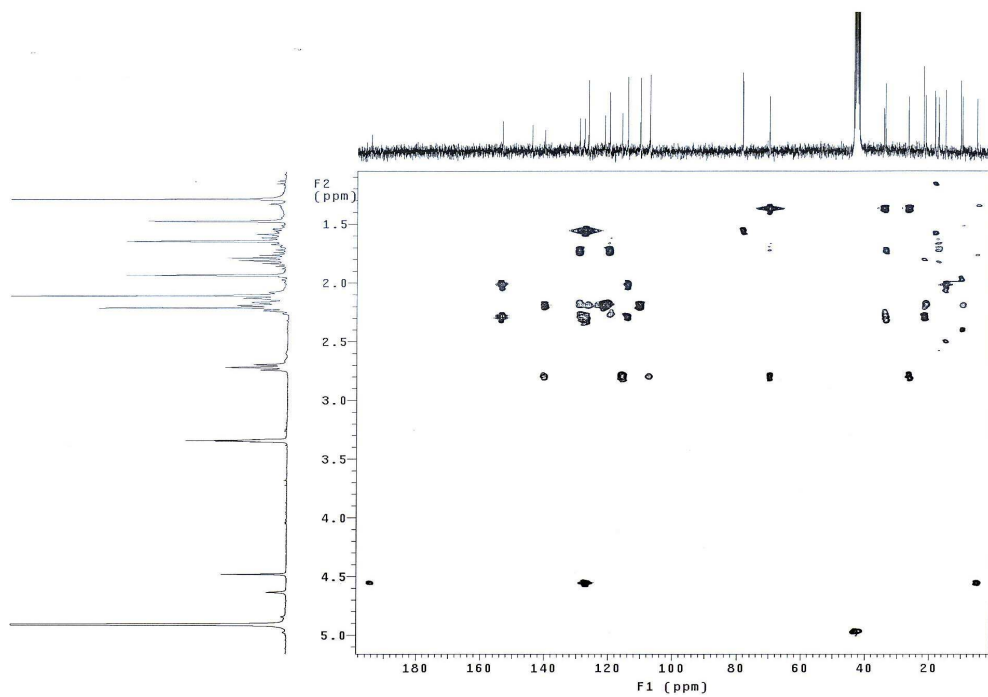


Fig. 23. gHMBC spectrum of compound 3 in CD₃OD

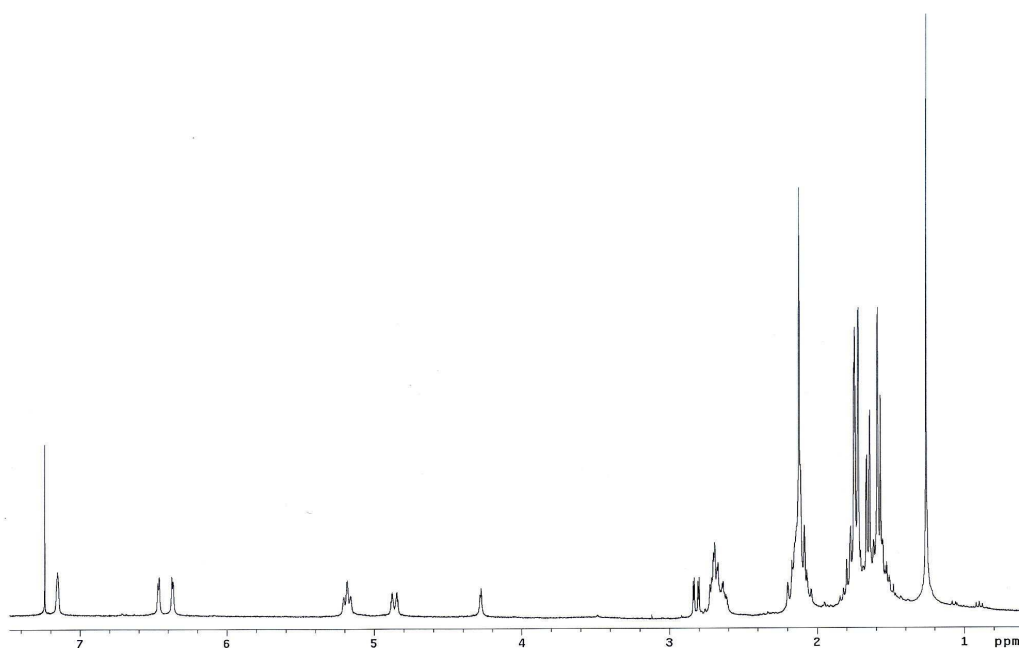


Fig. 24. ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

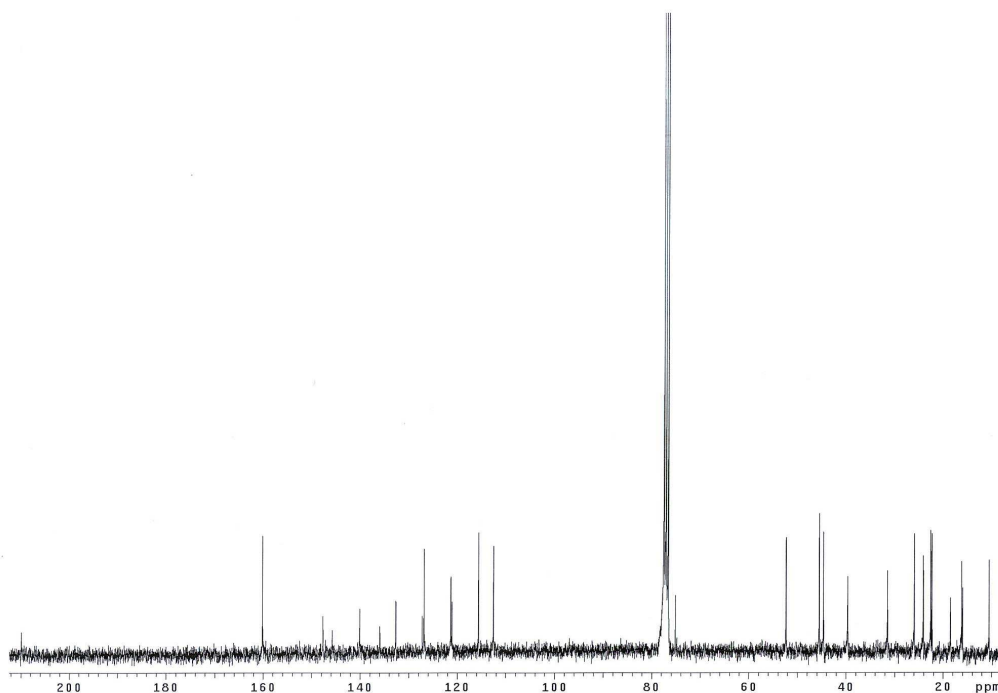


Fig. 25. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

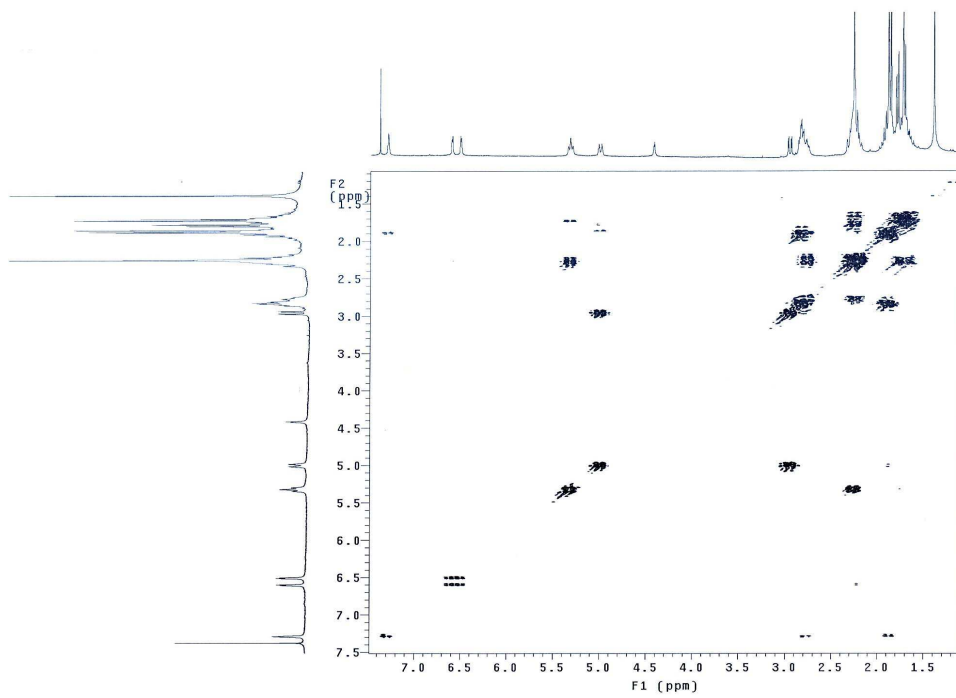


Fig. 26. gDQCOSY spectrum of compound 4 in CDCl₃.

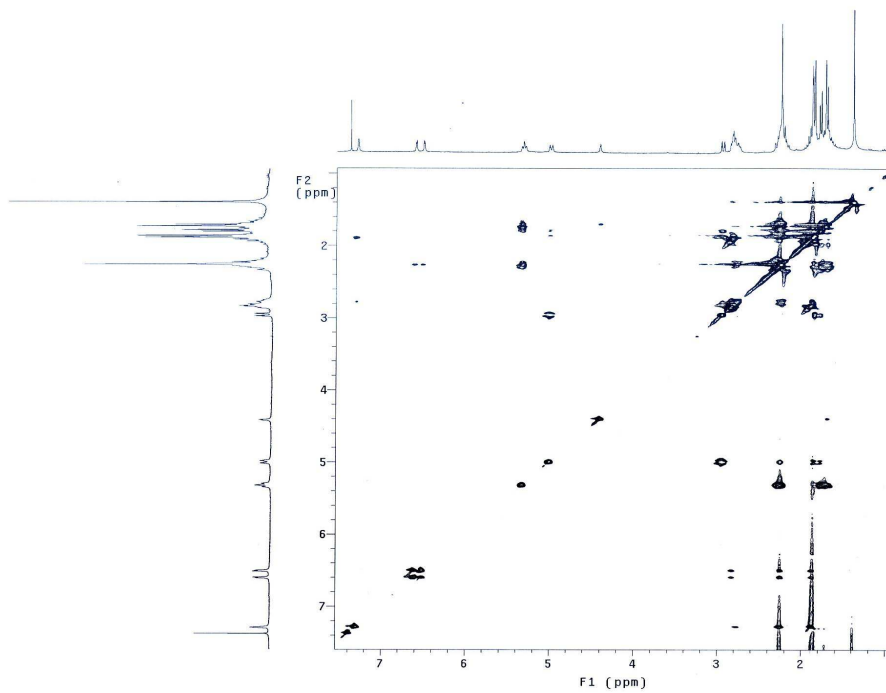


Fig. 27. TOCSY spectrum of compound 4 in CDCl₃.

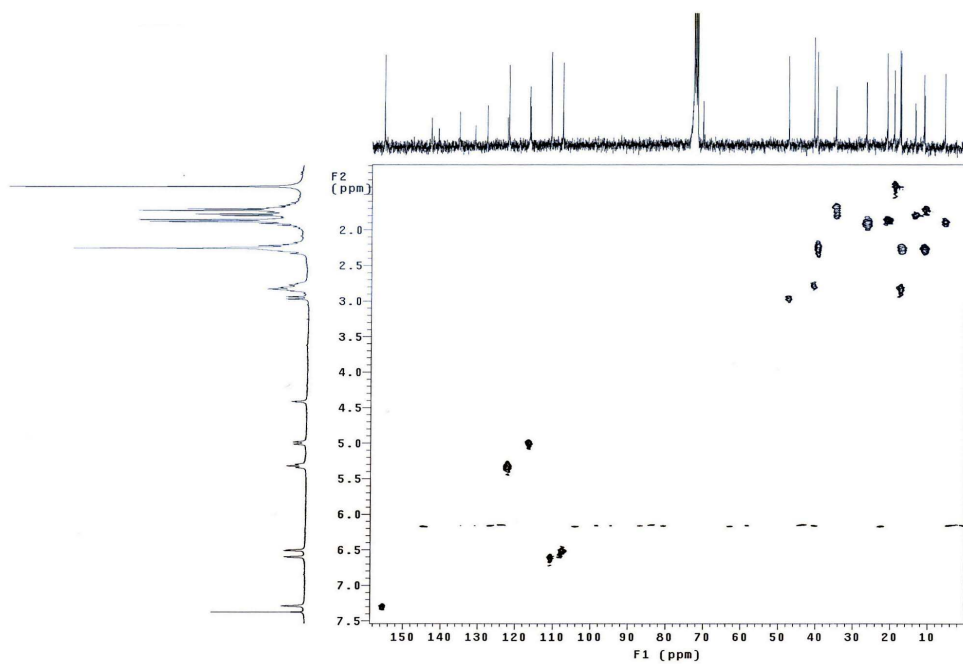


Fig. 28. gHMBC spectrum of compound 4 in CDCl₃.

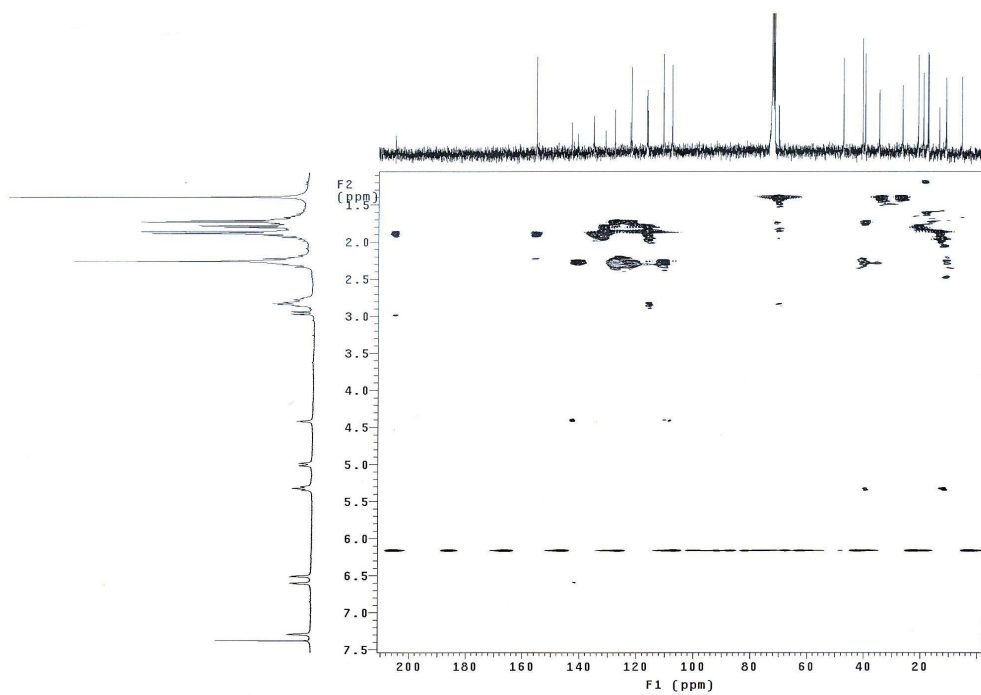


Fig. 29. gHMBC spectrum of compound 4 in CDCl₃.

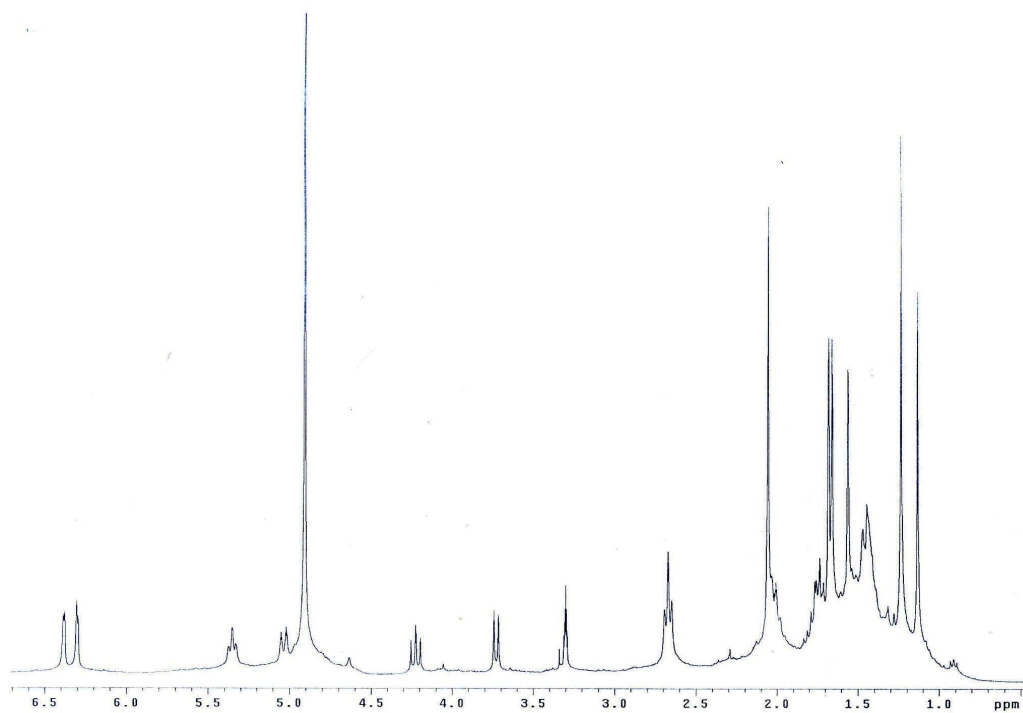


Fig. 30. ¹H NMR spectrum of compound 5 in CD₃OD.

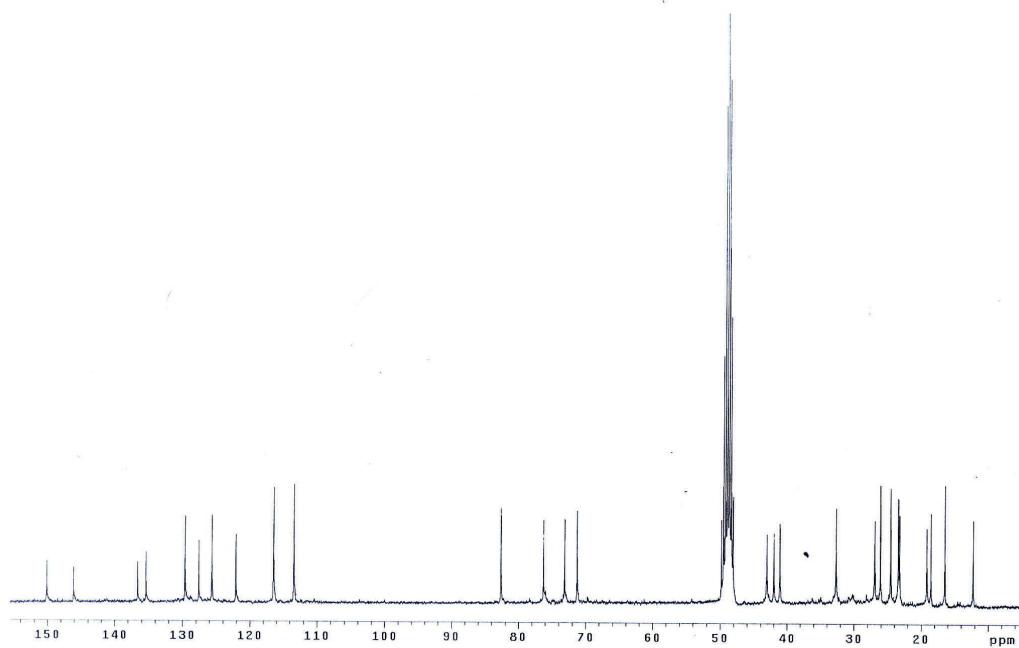


Fig. 31. ¹³C NMR spectrum of compound 5 in CD₃OD.

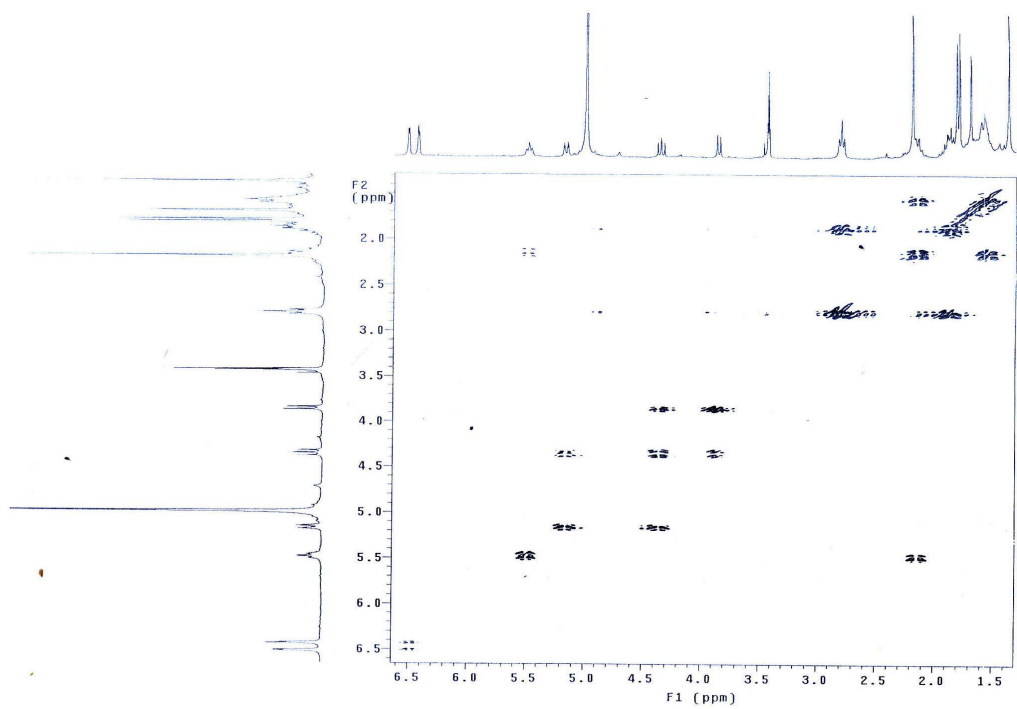


Fig. 32. gDQCOSY spectrum of compound 5 in CD₃OD.

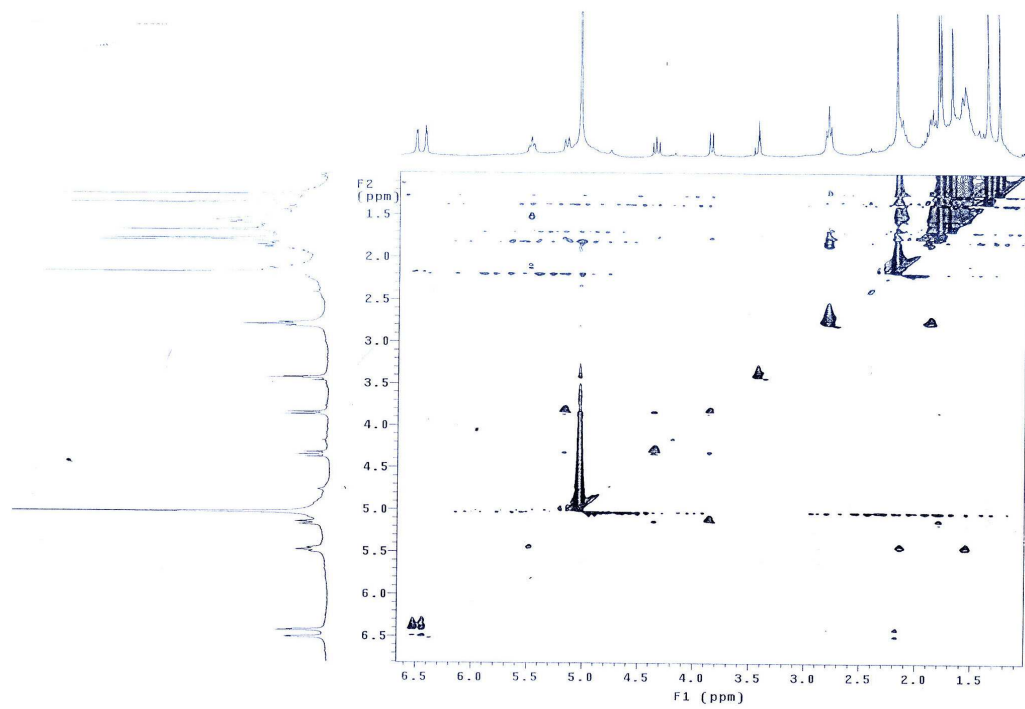


Fig. 33. TOCSY spectrum of compound 5 in CD₃OD.

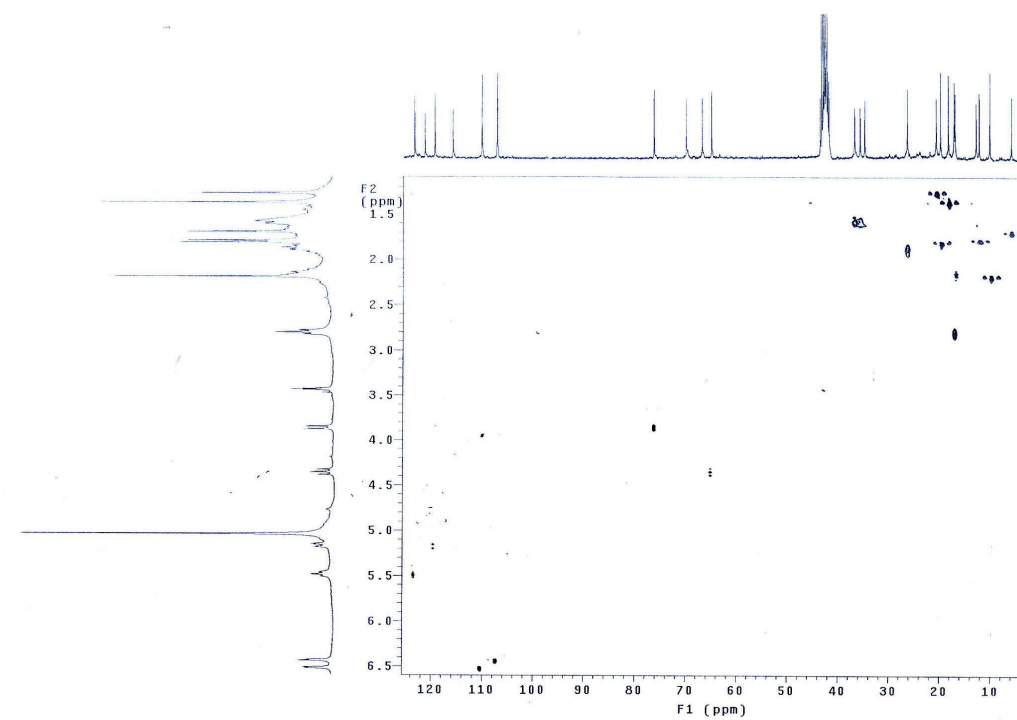


Fig. 34. gHMQC spectrum of compound 5 in CD_3OD .

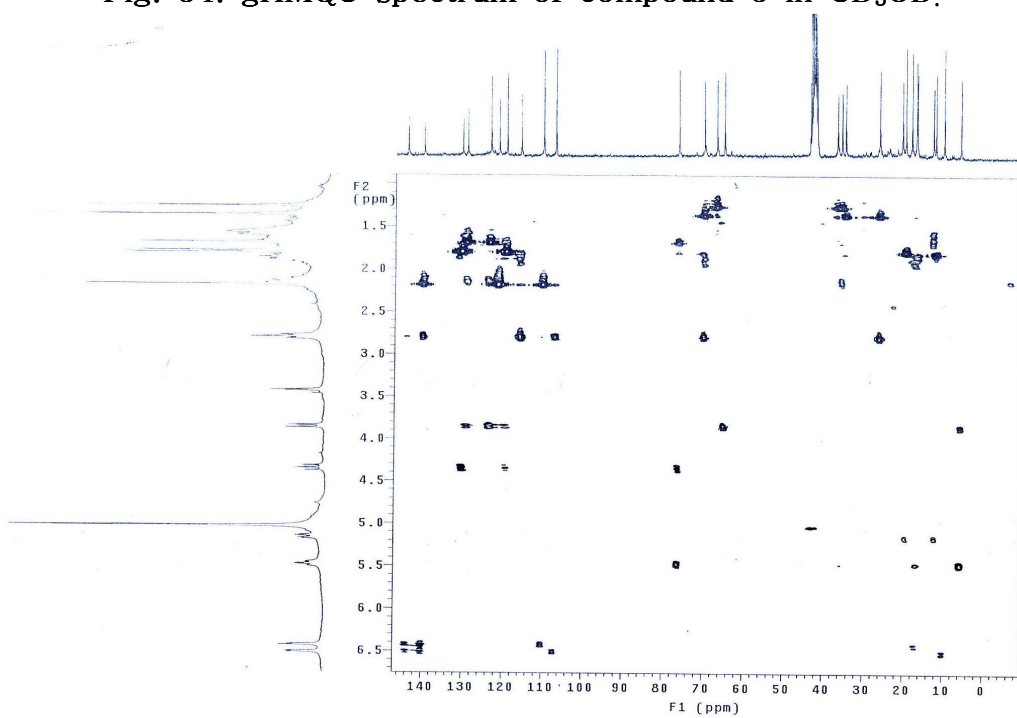


Fig. 35. gHMBC spectrum of compound 5 in CD_3OD

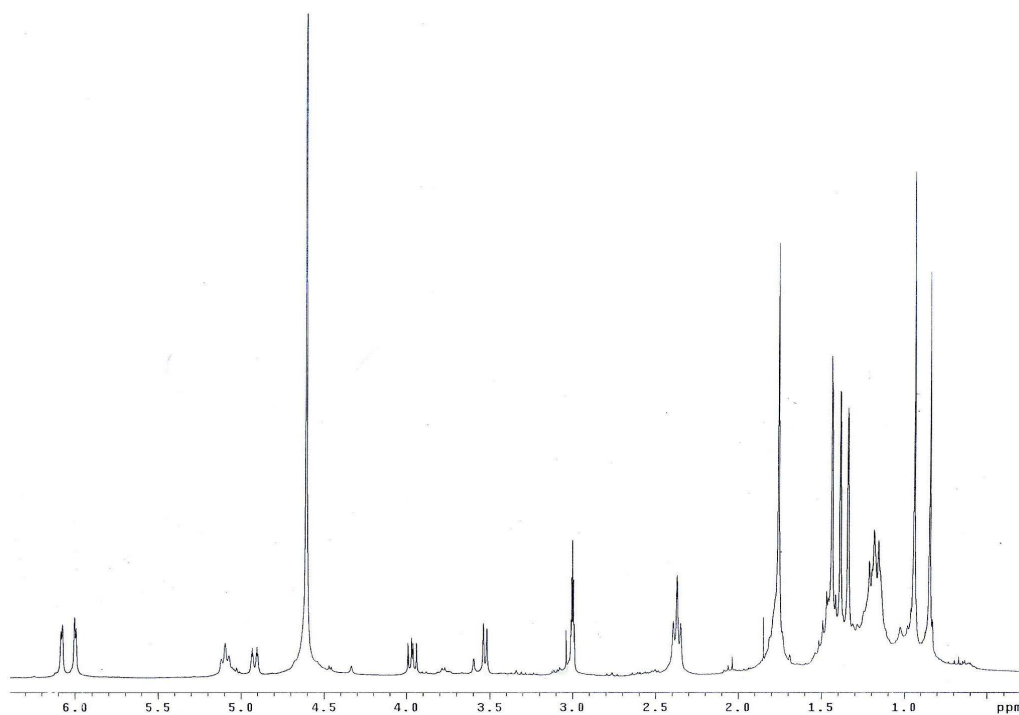


Fig. 36. ^1H NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3

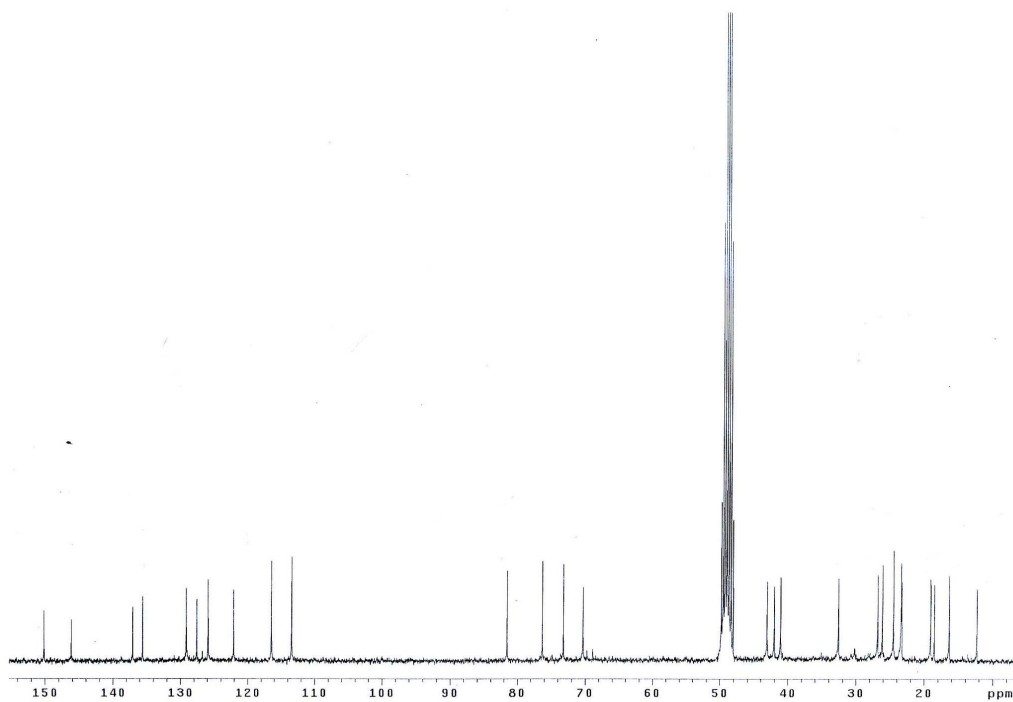


Fig. 37. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3

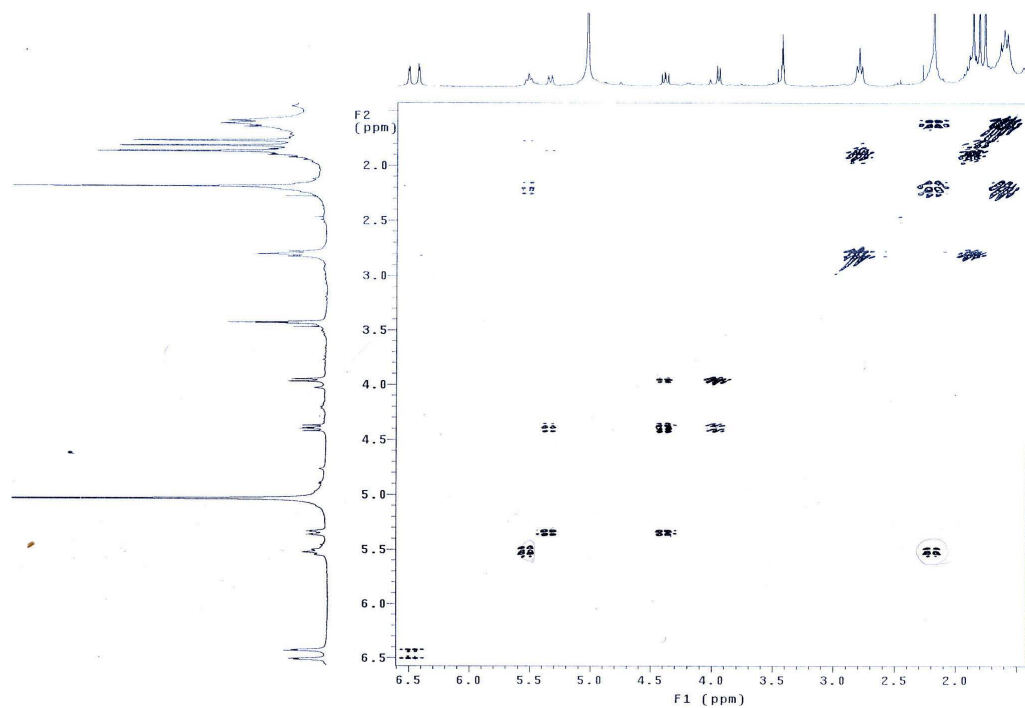


Fig. 38. gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD₃OD

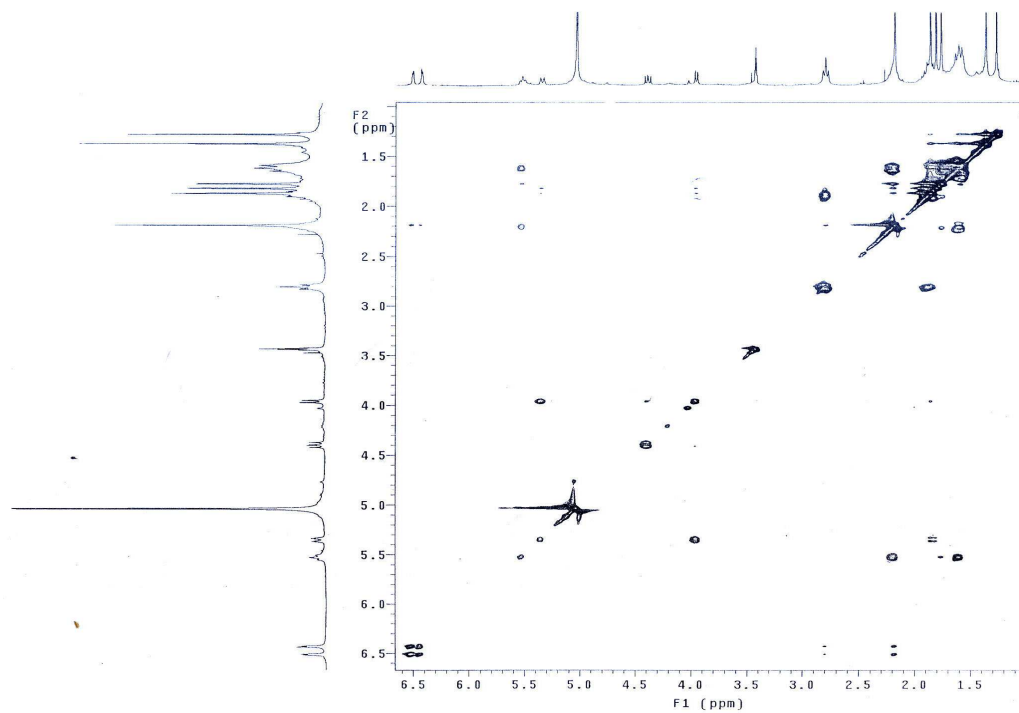


Fig. 39. TOCSY spectrum of compound 6 in CD₃OD

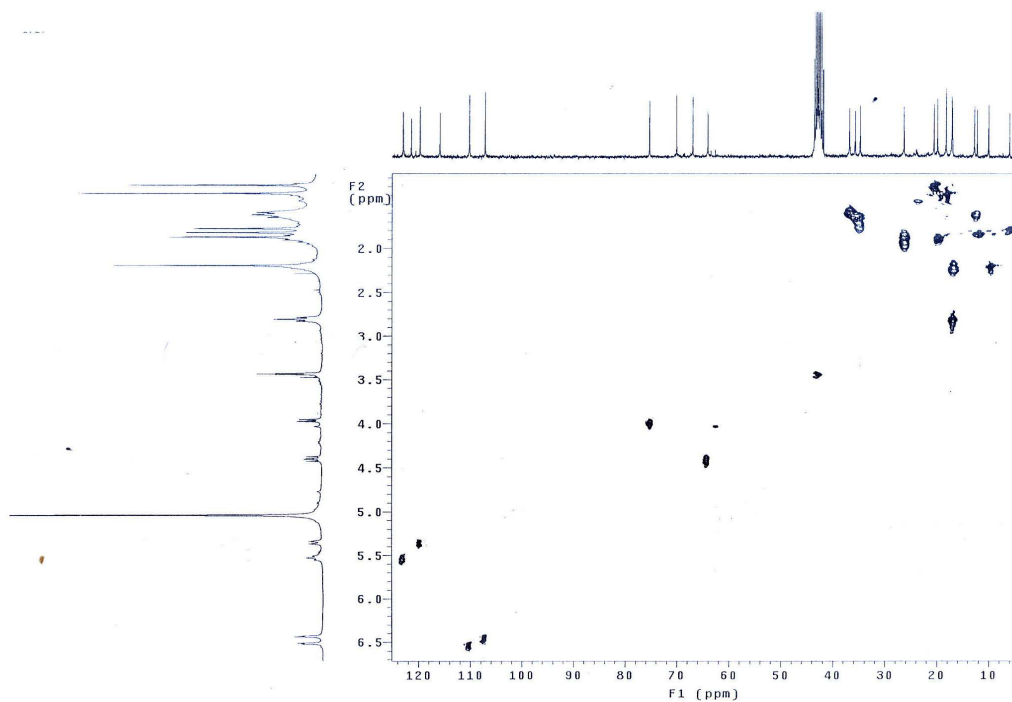


Fig. 40. gHMQC spectrum of compound 6 in CD₃OD

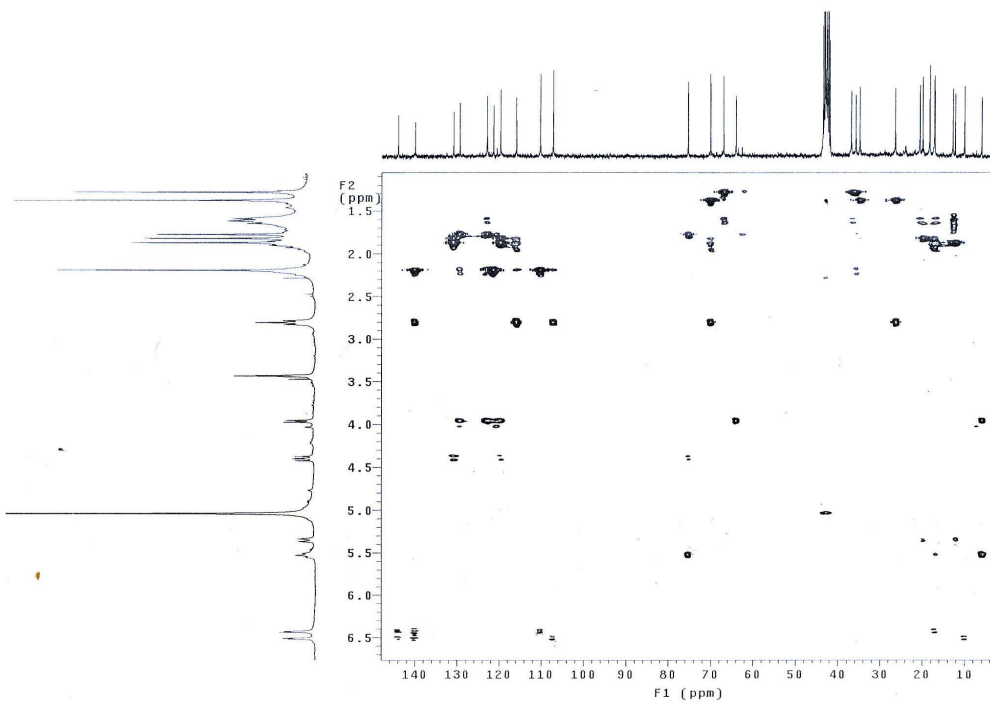


Fig. 41 gHMBC spectrum of compound 6 in CD₃OD

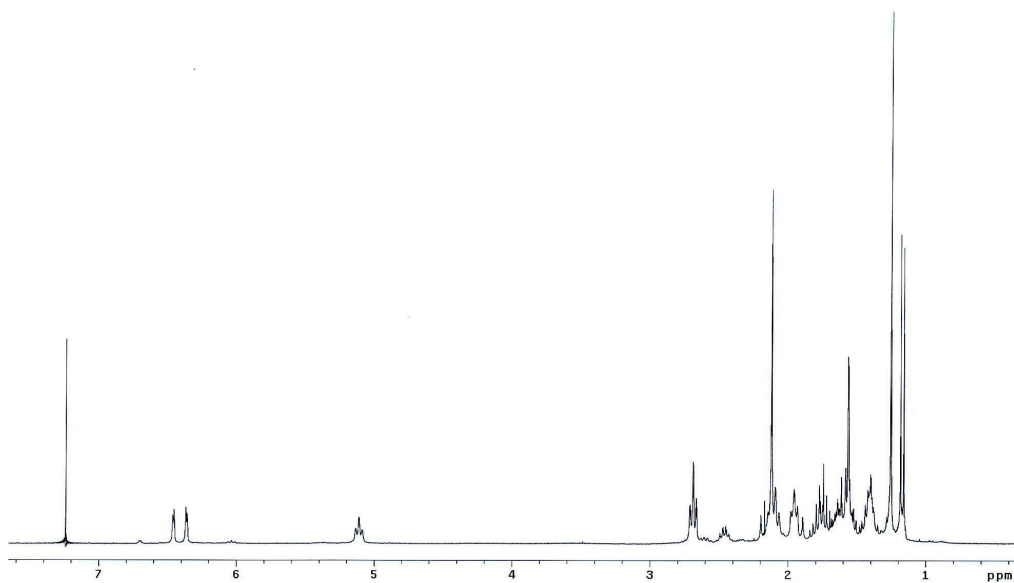


Fig. 42 ^1H NMR spectrum of compound 7 in CDCl_3 .

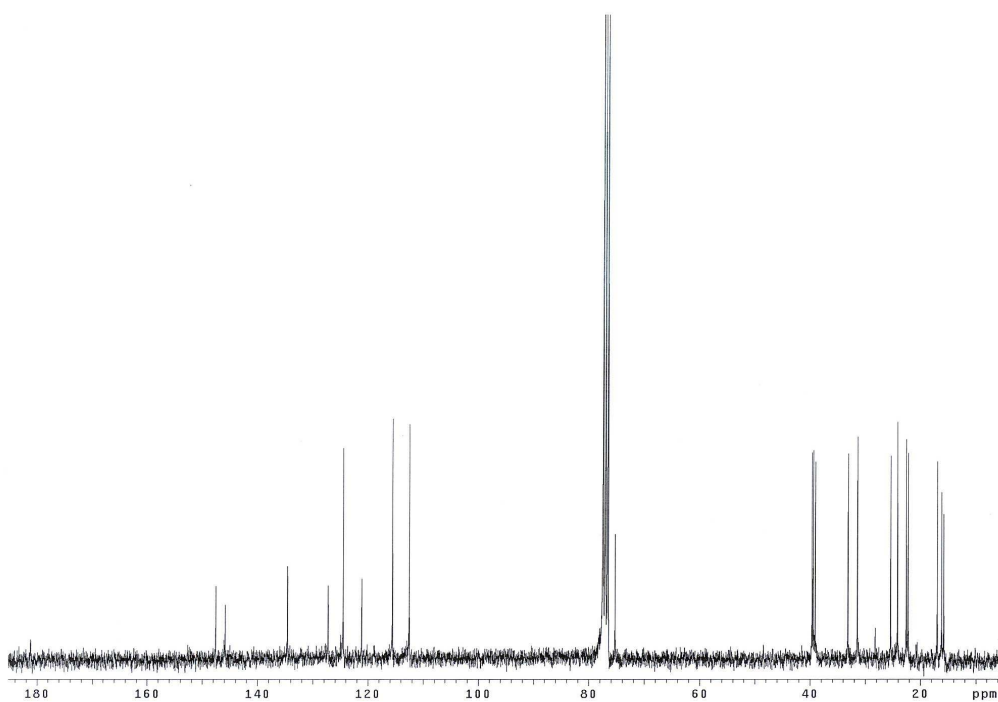


Fig. 43. ^{13}C NMR spectrum of compound 7 in CDCl_3 .

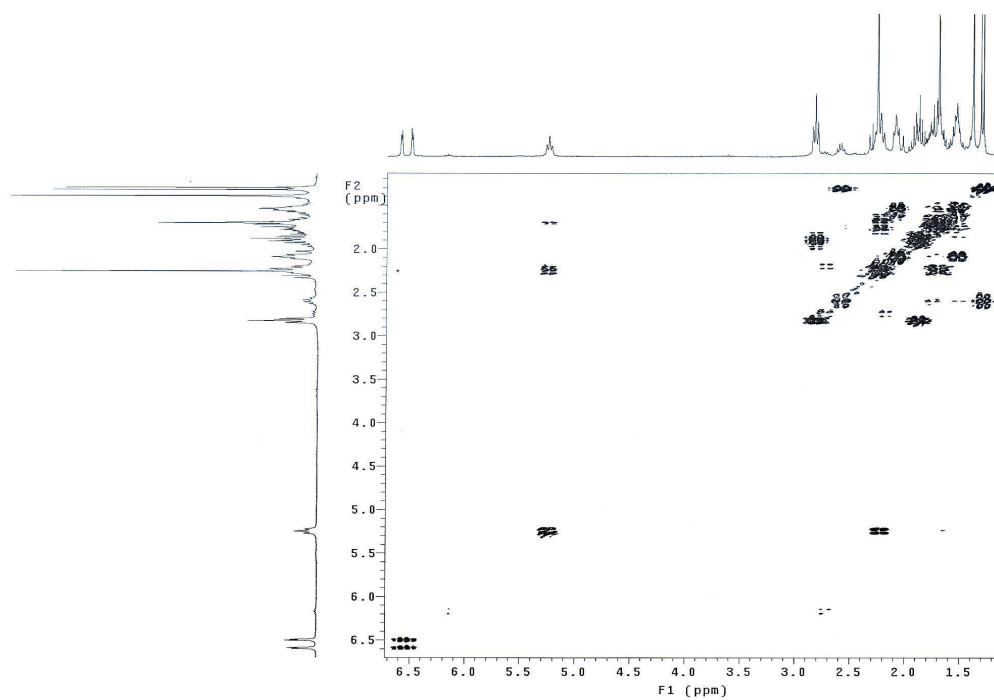


Fig. 44. gDQCOSY spectrum of compound 7 in CDCl_3 .

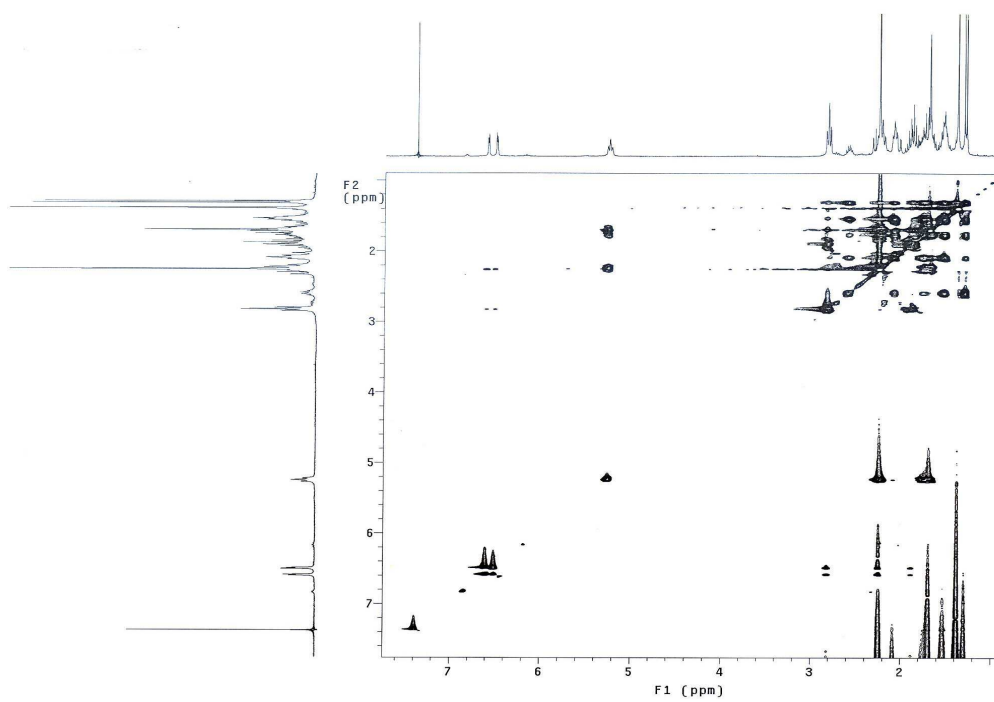


Fig. 45. TOCSY spectrum of compound 7 in CDCl_3 .

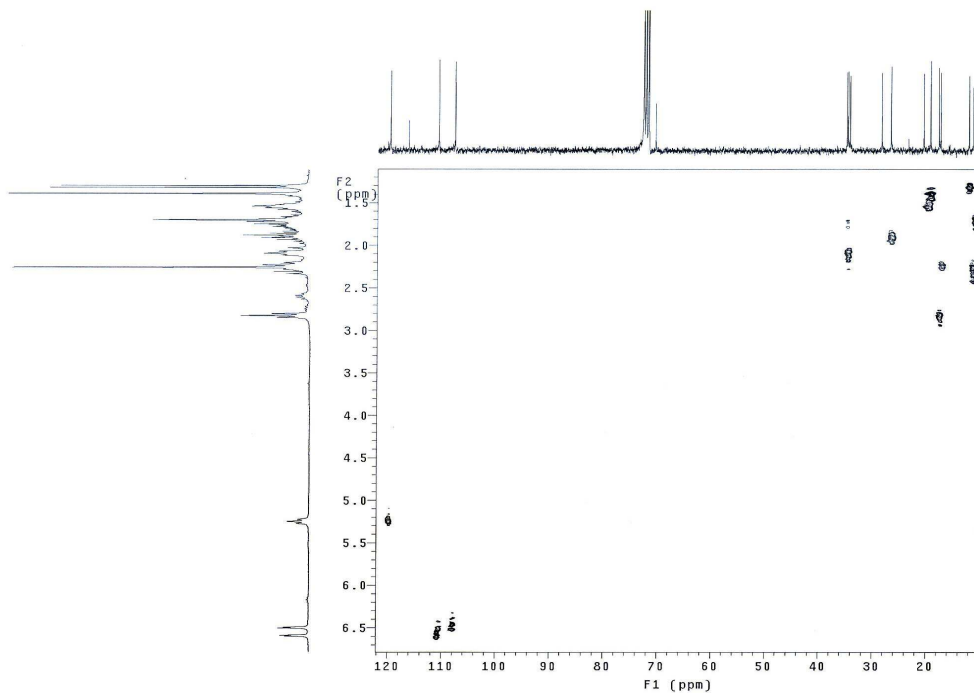


Fig. 46. gHMQC spectrum of compound 7 in CDCl₃.

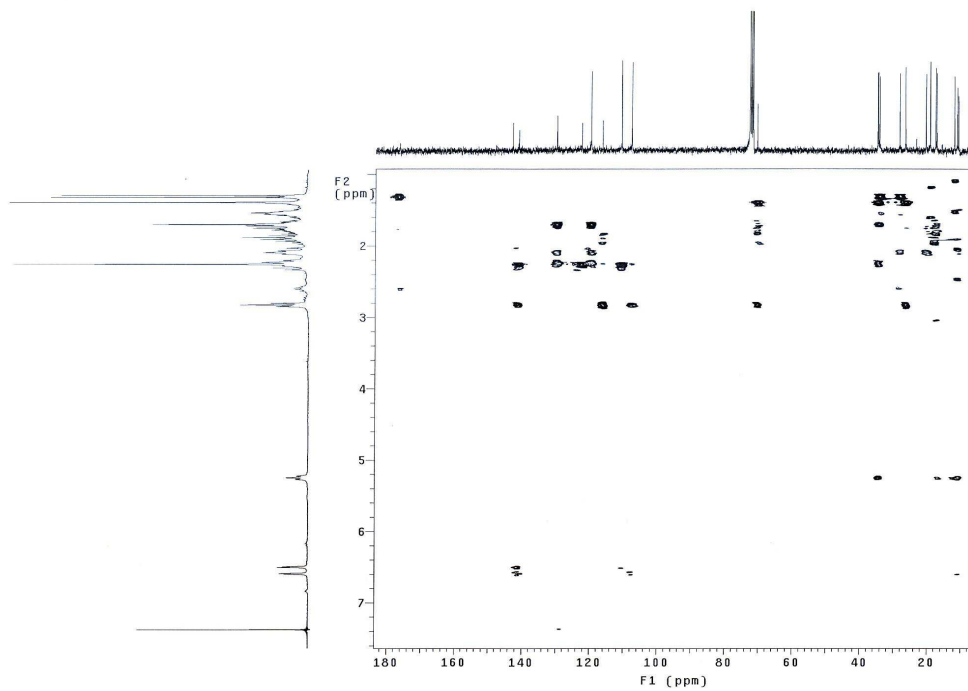


Fig. 47. gHMBC spectrum of compound 7 in CDCl₃.

3-2. *In vitro* 항산화 활성

(1) 파배기 모자반의 조추출물과 용매 분획 활성

1) DPPH radical 소거 활성

파배기 모자반을 acetone과 CH₂Cl₂의 1:1 혼합용매로 추출하여 얻어진 조추출물 (A+M) 과 MeOH 용매로 추출한 조추출물(MeOH)을 혼합한 후에 사용하는 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O fractions을 각각 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA 를 사용하였다.

검색결과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군 L-ascorbic acid는 96.86% 의 소거 효과를 보였으며, BHA는 81.59 % 의 소거 효과를 나타내었다. 이와 비교 시 조추출물인 A+M extract(36.35%)와 MeOH extract(23.96%)는 높은 효과를 나타내지 않았지만, 조추출물을 혼합하여 분획되어진 4개의 fractions에서는 DPPH radical 소거 활성 효과를 나타내었다. 4개의 fractions 중 85% aq.MeOH fraction이 67.26 %로 가장 높은 radical 소거 활성 효과를 나타내었으며, *n*-hexane (29.29%), *n*-BuOH (22.28%), H₂O (12.24%) fractions의 순서로 소거 활성 효과가 나타났다.

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 85% aq.MeOH의 radical 소거 활성 효과가 43.72 %로 합성항산화제인 BHA의 50.21 % 와 비슷한 효과를 보였다(Table 10).

DPPH radical 소거 활성을 측정한 6가지의 시료는 정제되지 않은 상태이며, 대조군으로 사용한 단일 화합물인 L-ascorbic acid와 BHA를 비교 한 것을 고려하였을 때, 85% aq.MeOH fraction에 항산화 효과가 뛰어난 물질이 존재 할 것으로 예상된다.

Table 10. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from *Sagassum siliquastrum* (EDA(%))

Sample	Concentration		
	200 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
A+M	36.35	29.69	25.83
MeOH	23.96	24.69	19.69
<i>n</i> -hexane fr.	29.29	24.58	20.82
85% aq. MeOH fr.	67.26	57.22	43.72
<i>n</i> -BuOH fr.	22.28	17.36	15.79
H ₂ O fr.	12.24	11.40	11.51
BHA	81.59	83.47	52.51
L-ascorbic acid	96.86	96.55	96.76

2) Peroxynitrite 소거 활성

조추출물 A+M 과 MeOH 그리고 분획하여 얻어진 4개의 fractions인 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 SIN-1 과 authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 SIN-1을 처리한 결과, 100, 50, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군 L-ascorbic acid는 102.08%, 95.45%, 96.51%를 보였으며, penicillamine은 107.01%, 102.42%, 101.03%를 나타내었다. 대조군과 비교시 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 조추출물 A+M extract와 MeOH extract 모두 높은 활성을 보였으며, A+M의 경우에는 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 82.04%, 63.68%로 높은 활성을 나타냈다. 분획물의 경우 모든 fractions에서 활성이 높게 나타났으며, 특히 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH fractions은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100.07%, 104.02%로 대조군과 상응하는 활성을 보였다. 두 fractions 모두 농도 의존적으로 활성이 나타났으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 각각 82.90%, 75.73%로 높은 활성을 나타내었다. H₂O fraction은 각각의 농도에서

81.68%, 70.77%, 59.17%의 순서로 활성을 나타내었으며 *n*-hexane fraction 은 75.06%, 61.18%, 54.77%의 순으로 활성 효과가 나타났다(Table 11).

Authentic peroxyntirite를 측정된 결과 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid와 penicillamine은 측정된 모든 농도에서 100%에 해당하는 소거 활성을 나타내었으며, 전반적으로 SIN-1의 측정 결과 보다 낮게 나온 것을 확인 할 수 있었다. 조추출물에 대해 측정된 결과 A+M extract만이 100과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 71.35 %, 58.32%로 50% 이상의 소거 활성을 나타내었으며, MeOH extract에서는 높게 나타나지 않았다. 4개의 fractions인 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O을 각각 측정된 결과 모두 높은 활성을 나타냈으며, 특히 85% aq.MeOH fraction 과 *n*-BuOH fraction에서 농도 의존적으로 모든 농도에서 50% 이상의 활성 효과를 보였다. H₂O fraction은 각각의 농도에서 79.88 %, 56.24%, 34.23%의 순서로 활성을 나타내었으며 *n*-hexane fraction 은 54.89%, 46.93%, 34.89%의 순으로 활성 효과가 나타났다(Table 12).

SIN-1과 authentic peroxyntirite에 대한 소거 활성 측정에서 동일한 형태로 활성 효과가 나타났으며, 조추출물에서는 A+M extract가 활성을 나타내었으며, 용매분획에서는 85% aq.MeOH 과 *n*-BuOH fractions에서 소거 활성이 높게 나타났다. 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH fractions을 더 정제 분리 할 경우 높은 활성을 가지는 화합물을 얻을 수 있을 것으로 예상 된다.

Table 11. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from *Sagassum siliquastrum* on ONOO⁻ from SIN-1.

Sample	Concentration		
	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
A+M	89.85 \pm 0.66	82.04 \pm 0.40	63.68 \pm 0.92
MeOH	77.09 \pm 0.10	27.38 \pm 0.34	29.95 \pm 1.35
<i>n</i> -hexane fr.	75.06 \pm 1.49	61.18 \pm 0.13	54.77 \pm 0.21
85% aq. MeOH fr.	100.07 \pm 0.23	86.94 \pm 0.60	82.90 \pm 0.17
<i>n</i> -BuOH fr.	104.02 \pm 0.02	80.77 \pm 0.31	75.73 \pm 0.02
H ₂ O fr.	81.68 \pm 0.85	70.77 \pm 1.49	59.17 \pm 0.16
L-ascorbic acid	102.08 \pm 0.33	95.45 \pm 0.06	96.51 \pm 0.73
Penicillamine	107.01 \pm 0.39	102.42 \pm 0.38	101.03 \pm 0.50

Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

Table 12. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from *Sagassum siliquastrum* on authentic ONOO⁻

Sample	Concentration		
	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
A +M	71.35 \pm 1.18	58.32 \pm 1.15	41.95 \pm 0.74
MeOH	44.85 \pm 0.52	27.89 \pm 0.74	15.19 \pm 0.30
<i>n</i> -hexane fr.	54.89 \pm 0.74	46.93 \pm 0.23	34.89 \pm 0.09
85% aq. MeOH fr.	85.29 \pm 0.09	69.74 \pm 0.86	48.55 \pm 0.04
<i>n</i> -BuOH fr.	80.69 \pm 0.31	68.70 \pm 1.01	55.76 \pm 0.15
H ₂ O fr.	79.88 \pm 0.30	56.24 \pm 0.58	34.23 \pm 1.08
L-ascorbic acid	100.15 \pm 0.03	100.05 \pm 0.01	99.95 \pm 0.03
Penicillamine	100.21 \pm 0.24	99.52 \pm 0.02	98.81 \pm 0.14

Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

(2) 과배기 모자반의 compound 1-7 활성

1) DPPH radical 소거 활성

85% aq. MeOH fraction에서 분리한 7개의 화합물을 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 조추출물과 용매분획들의 실험과 동일한 방법과 대조군(L-ascrobic acid 와 BHA)을 사용하여 측정하였으며, 농도는 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하였다.

검색 결과 대조군인 L-ascrobic acid가 모든 농도에서 97% 이상의 소거 활성효과를 보였으며, 합성 항산화제인 BHA의 경우 농도 의존적으로 58.33%, 43.23%의 radical 소거 활성을 나타내었다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50% 이상의 radical 소거 활성 효과를 보인 화합물은 compound 5(78.33%), compound 7 (66.35%), compound 1(62.60%) 그리고 compound 3(53.23%) 순으로 높은 활성을 보였으며, 특히 compound 4, compound 7 그리고 compound 1의 경우 대조군으로 사용된 L-ascrobic acid 보다는 떨어지지만 합성 항산화제 BHA 보다 높은 활성을 보였으며, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 각각 54.27%, 44.58%, 46.88%로 BHA 43.23%보다 높은 활성을 나타내었다. Compound 2(44.38%, 30.97%), compound 6(40.10%, 28.96%), compound 5(35.94%, 30.94%)는 분리된 다른 화합물보다는 낮은 활성을 보였지만, 대조군 BHA와 비교 시 큰 차이를 보이지 않았으므로, radical 소거 활성 효과가 있는 것으로 예상된다(Table 13).

Table 13. Scavenging effect of compounds 1-7 from *Sagassum siliquastrum* on DPPH radical

Sample	Concentration	
	50 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$
1	62.60	44.58
2	44.38	30.94
3	53.23	38.33
4	78.33	54.27
5	35.94	26.35
6	40.10	28.96
7	66.35	46.88
BHA	58.33	43.23
L-ascorbic acid	97.40	97.40

2) Peroxynitrite 소거 활성

85% aq . MeOH fraction에서 분리한 7개의 화합물을 SIN-1과 authentic peroxynitrite을 검색하였다. 조추출물과 용매 분획물의 실험과 동일한 방법으로 실험을 행하였으며, 대조군 L-ascorbic acid와 penicillamine를 사용하여 측정하였으며, 농도는 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하였다.

SIN-1 을 처리한 결과 대조군 L-ascorbic acid와 penicillamine 모두 100% 에 해당하는 소거 활성 효과를 보였다. 분리된 compound 1-7 모두 모든 농도에서 높은 소거 활성 효과를 나타내었으며, 낮은 농도 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 60%이상의 소거 활성을 보였다. Compound 6의 경우 농도 의존적으로 88.98%, 72.82%로 가장 높은 소거 활성을 보였으며, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 compound 6 다음으로 compound 2(80.14%), compound 3(79.35%), compound 5(77.35%), compound 1(77.05%), compound 4(76.37%), compound 7(70.32%) 의 순서대로 활성 효과가 나타났다(Table 14).

다음으로 Authentic peroxynitrite를 처리한 결과 대조군 L-ascorbic acid는 농도

50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100%에 달하는 소거 활성을 보였으며, penicillamine은 99.64%, 92.29%의 소거 활성을 보였다. 모든 화합물에서 높은 활성 효과를 나타내었으며, 그 중 88.08%, 79.35%로 compound 6에서 매우 높은 활성 효과를 보였다. 두 번째로 compound 1이 85.37%, 70.58%로 높은 활성을 보였으며, compound 5(84.45%, 70.42%) compound 7(77.77%, 62.44%), compound 2(73.58%,59.69%), 그리고 compound 4(70.83%, 56.36%)의 순으로 효과가 나타났다(Table 15).

SIN-1 과 Authentic peroxyntirite 처리 결과 분리된 화합물 모두 항산화 효과가 있는 것으로 나타났으며, 그 중 compound 6이 모든 부분에서 가장 활성 효과가 뛰어났으며, 이 활성 효과는 대조군과 상응하는 효과를 지니고 있음을 확인 하였다.

Table 14. Scavenging effect of compounds 1-7 from *Sargassum siliquastrum* on ONOO⁻ from SIN-1.

Sample	Concentration	
	50 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$
1	77.05 \pm 1.24	62.62 \pm 0.79
2	80.14 \pm 0.00	62.62 \pm 0.00
3	79.35 \pm 0.82	60.75 \pm 1.53
4	76.37 \pm 0.47	69.04 \pm 0.05
5	77.35 \pm 0.45	67.42 \pm 0.18
6	88.98 \pm 0.63	72.82 \pm 0.18
7	70.32 \pm 0.81	65.35 \pm 0.47
L-ascorbic acid	97.70 \pm 0.445	97.85 \pm 1.24
Penicillamine	101.85 \pm 0.29	102.43 \pm 0.10

Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

Table 15. Scavenging effect of compounds 1-7 from *Sargassum siliquastrum* on authentic ONOO⁻

Sample	Concentration	
	50 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$
1	85.37 \pm 0.39	70.85 \pm 0.99
2	73.58 \pm 0.52	59.69 \pm 0.89
3	64.97 \pm 0.68	53.21 \pm 0.39
4	70.83 \pm 0.10	56.36 \pm 0.39
5	84.45 \pm 0.46	70.42 \pm 1.06
6	88.08 \pm 0.14	79.35 \pm 0.03
7	77.77 \pm 0.66	62.44 \pm 0.93
L-ascorbic acid	100.25 \pm 0.03	100.11 \pm 0.01
Penicillamine	99.64 \pm 0.24	92.29 \pm 0.02

Each data is represented as the mean \pm SEM of three experiments.

3-2. 세포수준의 항산화 활성

(1) 파배기 모자반의 조추출물과 용매분획의 활성

1) MTT assay

MTT assay를 이용하여 파배기 모자반이 HT1080 cell의 viability에 미치는 영향을 확인하였다. A+M extract와 MeOH extract는 각각 5, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 측정하였으며, 각각의 농도에서 sample을 처리하지 않은 대조군과 유사한 흡광도를 나타내어, 조추출물은 5, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 HT1080 cell viability에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다(Fig.48)

조추출물을 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O fractions을 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 viability를 측정한 결과 대조군과 유사한 흡광도를 나타내었으며, 각각의 fractions 또한 측정한 농도에서 HT1080 cell viability에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다(Fig.49).

MTT assay를 측정하여 얻어진 cell viability의 측정결과 측정된 농도에서 viability에 영향을 주지 않았으므로 이를 바탕으로 HT1080 cell을 이용하여 영향을 주지 않는 농도 범위에서 ROS, DNA oxidation, GSH를 측정하였다.

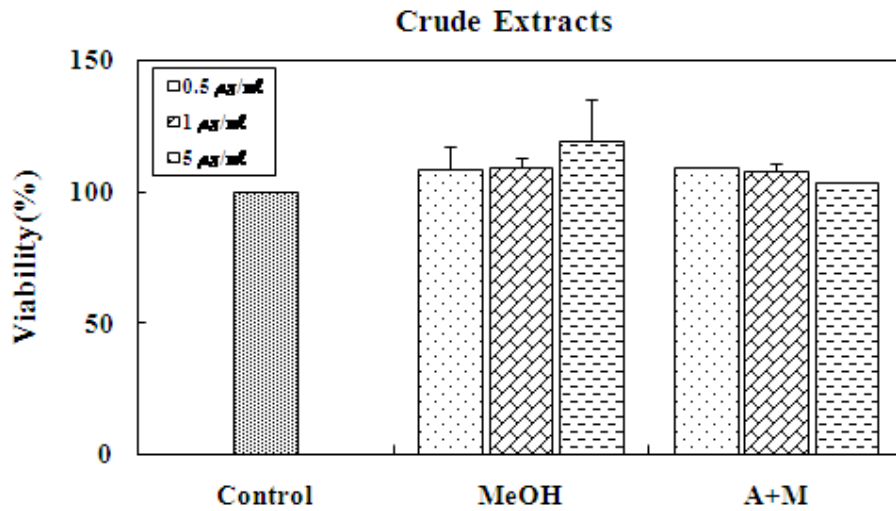


Fig.48 Effect of crude extracts from *Sargassum spiliquastrum* on viability of HT1080 cell

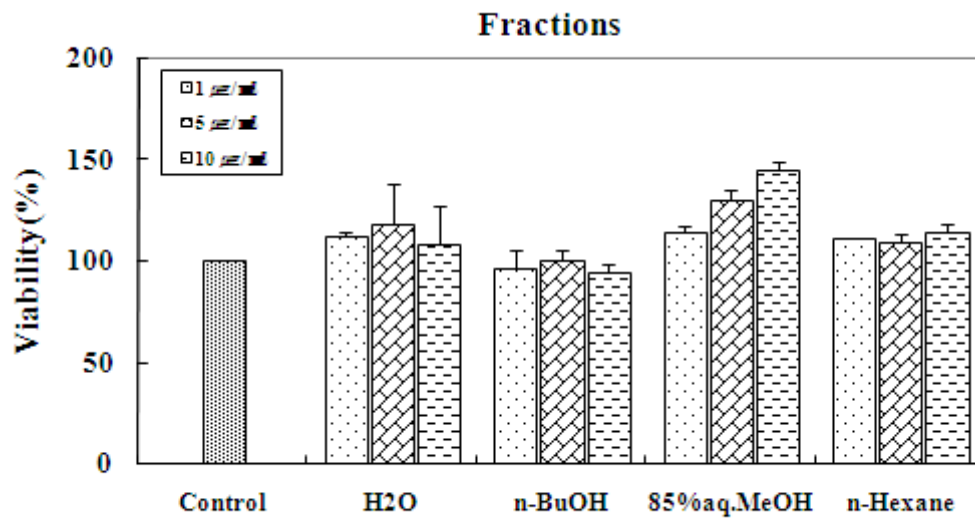
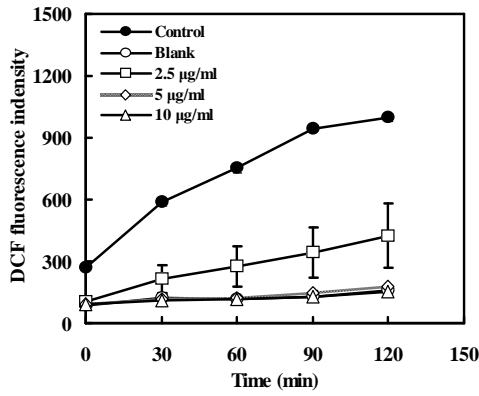


Fig.49 Effect of its solvent fractions from *Sargassum spiliquastrum* on viability of HT1080 cell

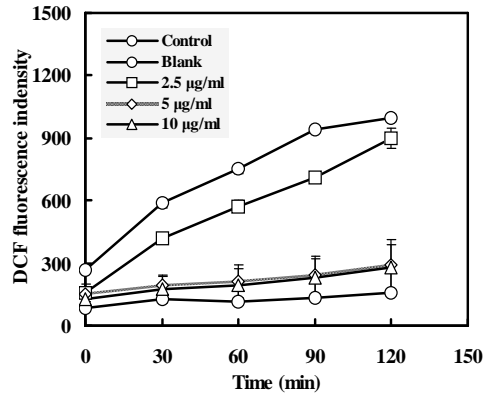
2) ROS (total free radical 측정)

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용하여 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였으며, 500 μM H_2O_2 를 처리한 후 0분부터 30분 간격으로 120분 동안 측정하여 파배기 모자반의 활성을 검색하였다. A+M과 MeOH extract는 각각 10, 5, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 sample을 넣지 않고 500 μM H_2O_2 를 처리한 control과 500 μM H_2O_2 를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 500 μM H_2O_2 를 처리한 control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, 500 μM H_2O_2 를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 높게 증가하지 않았다. 10, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 A+M과 MeOH extracts는 측정한 두 시간 동안 500 μM H_2O_2 를 처리하지 않은 blank와 비슷한 양상을 보이는 높은 활성을 나타내었다. 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 시간에 따라 증가하는 것이 보였으나 이는 500 μM H_2O_2 만을 처리한 control 보다 그 증가율이 현저히 낮았으므로 측정한 모든 농도에서 파배기 모자반 조추출물이 세포내 ROS 소거 활성에 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인 하였다(Fig.50)

조추출물을 용매 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H_2O fraction은 50, 10, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 3가지 농도로 500 μM H_2O_2 처리 후 2시간 동안 30분 간격으로 DCF fluorescence를 측정한 결과 4개의 fraction 모두 높은 활성을 보였다. 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, *n*-hexane fraction을 control과 blank로 비교하였을 때, 측정한 3 농도 모두에서 높은 활성을 보였으며, 측정한 2시간 동안 계속적으로 높은 항산화 활성을 보였다. H_2O fraction 또한 control과 비교하였을 때 큰 항산화 활성 나타내었으나 85% aq. MeOH fraction., *n*-BuOH fraction, *n*-hexane fraction. 보다는 낮은 항산화 활성을 보였다(Fig.51).

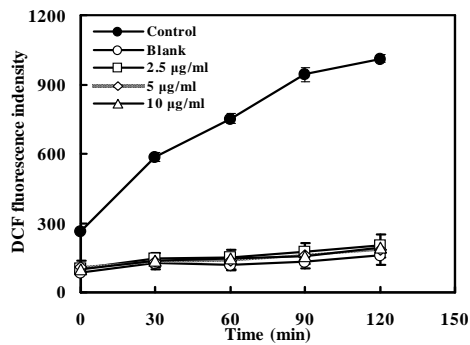


(a) A + M extract.

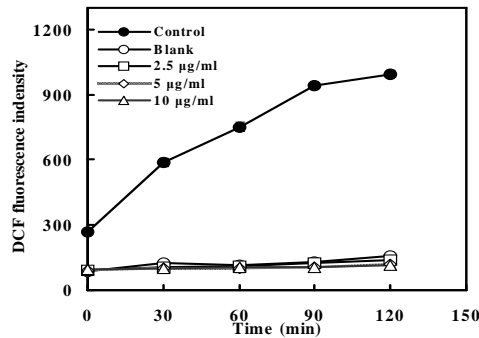


(b) MeOH extract.

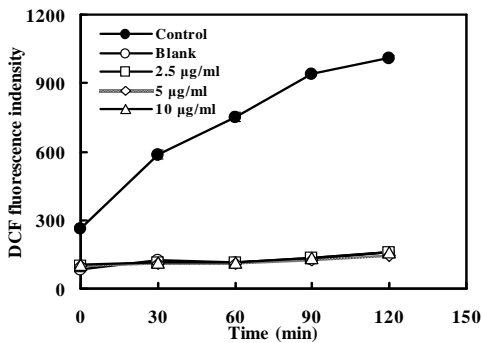
Fig. 50 Cellular radical scavenging effect of crude extracts from *Sagassum siliquastrm* in HT1080 cell..



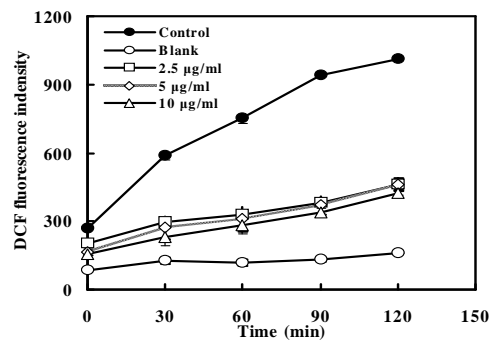
(a) n-Hexane fr.



(b) 85% aq. MeOH fr.



(c) n-BuOH fr.



(d) H₂O fr.

Fig.51 Cellular radical scavenging effect of its solvent fractions from *Sagassum siliquastrm* in HT1080 cell..

2) DNA 산화

파배기 모자반 유래의 조추출물의 DNA 산화에 미치는 영향을 5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 측정된 결과 MeOH 및 A+M 추출물은 농도 의존적으로 DNA 손상을 억제하는 효과를 보였다(Fig.52). 또한 이들 조추출물로부터 얻어진 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O fractions을 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 DNA 손상 정도를 측정된 결과 H₂O₂ 처리 10분 후 모든 fractions이 좋은 활성을 보였다(Fig.53). 그 중 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, *n*-hexane fractions이 control과의 비교하였을 때 매우 효과가 있는 것으로 나타났다.

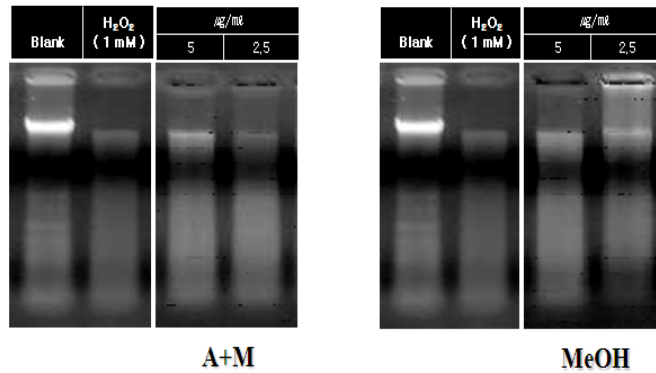


Fig. 52 Effect of crude extractions from *Sagassum siliquastrum* on genomic DNA oxidation

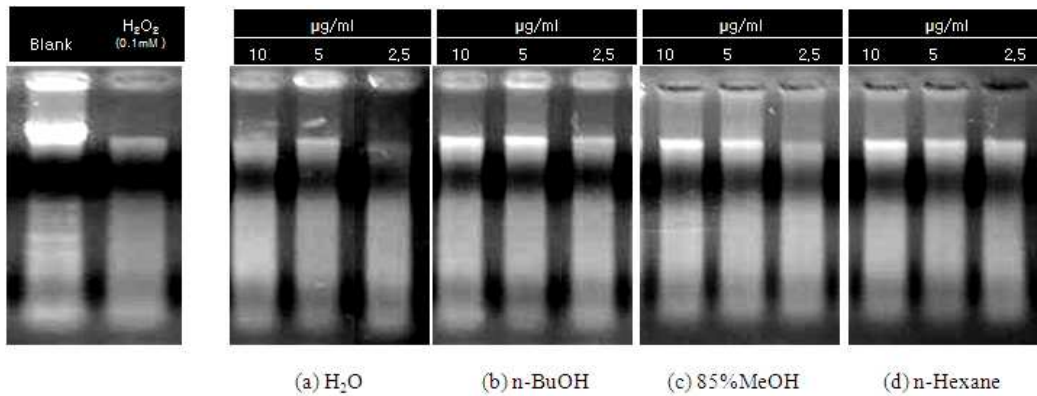


Fig. 53 Effect of its solvent fractions from *Sagassum siliquastrum* on genomic DNA oxidation

3) GSH 함량 측정

파배기 모자반이 세포내의 GSH 함량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 thiol-staining reagent인 mBBBr을 이용하여 측정하였다. 조추출물인 A+M, MeOH과 분획물 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fractions을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 측정하였으며, 120분 동안 30분 간격으로 측정하였다. 대조군은 sample을 처리하지 않은 blank로 측정하였다. 조추출물과 4개의 fractions에서 sample을 처리하지 않은 blank 보다 증가하는 것으로 나타났다(Fig.54, Fig.55).

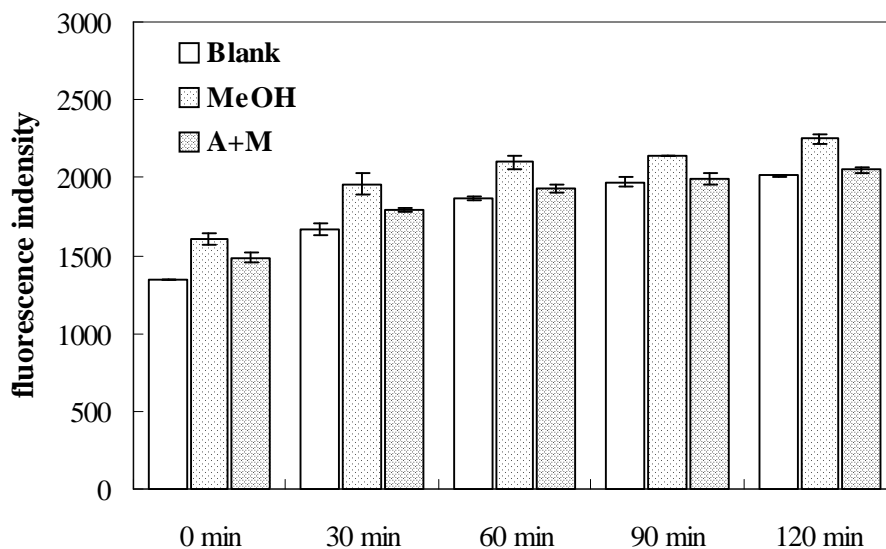


Fig. 54 Effect of crude extracts from *Sagassum siliquastrm* on GSH level in HT1080 cell.

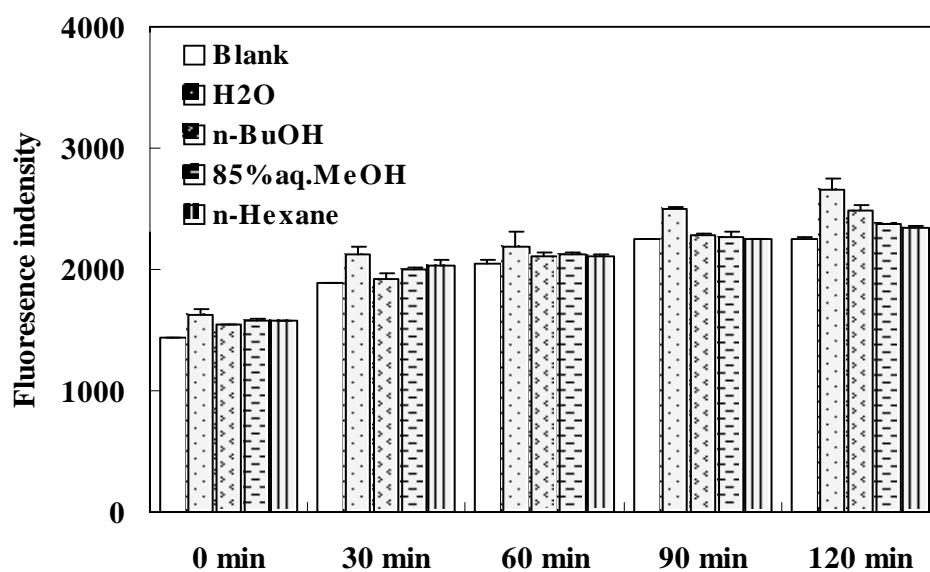


Fig. 55 Effect of its solvent fractions from *Sagassum siliquastrm* on GSH level in HT1080 cell.

(1) 파배기 모자반에서 분리한 compounds 1-7 의 효과

1) MTT assay

85% aq.MeOH fraction에서 분리 된 7개의 화합물의 cell viability를 측정하였다. 5, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 측정하였으며 7개의 화합물 모두 측정 농도에서 cell viability에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

MTT assay를 측정하여 얻어진 cell viability의 측정 결과 측정된 농도에서 viability에 영향을 주지 않았으므로 이를 바탕으로 HT1080 cell을 이용하여 영향을 주지 않는 농도 범위에서 ROS, GSH 를 측정하였다.

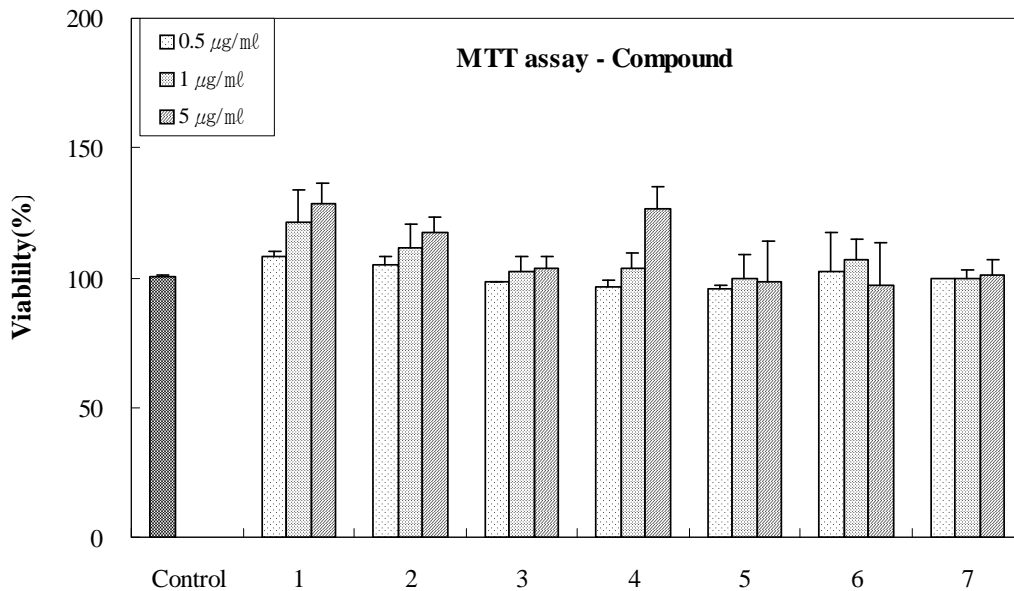


Fig. 56 Effect of compounds 1-7 from *Sargassum spiliquastrum* on viability of HT1080 cell

1) ROS (total free radical 측정)

85% aq. MeOH fraction에서 분리한 compound 1-7을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 DCFH-DA assay를 하였다. 500 μM H_2O_2 를 120분 동안 처리한 후 DCF fluorescence를 측정하였으며, 대조군으로 sample을 넣지 않고 500 μM H_2O_2 를 처리한 control과 500 μM H_2O_2 을 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

측정 결과 모든 화합물에서 높은 활성을 나타내었으며, compound 1이 가장 높은 활성이 나타내었으며 compound 7, compound 2, compound 5, compound 6, compound 3, compound 4 순으로 높은 활성을 보였다(Fig.57)

85% aq.MeOH에서 분리 화합물 모두 항산화 활성에 높은 물질임을 확인하였다.

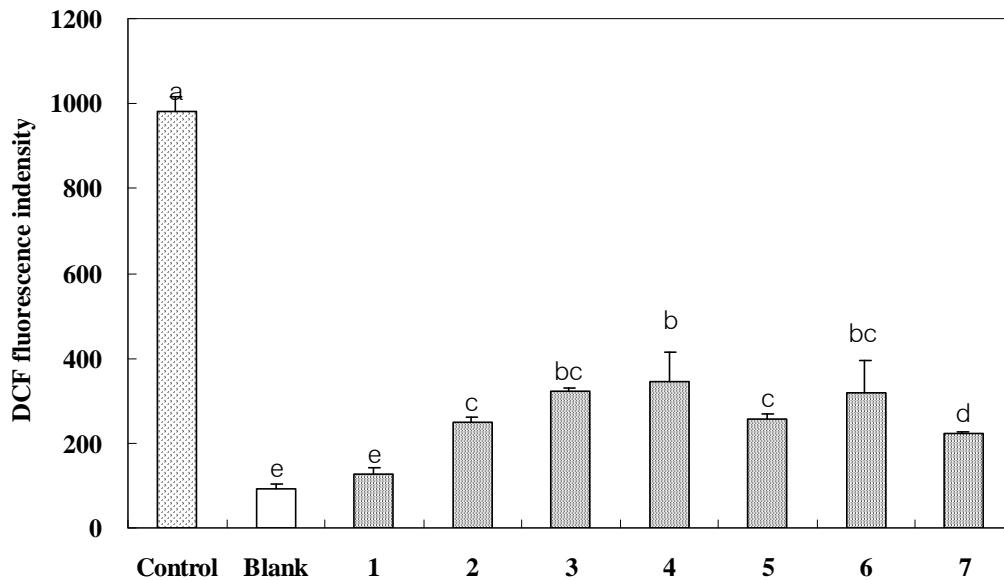


Fig. 57 Protective effect of compounds 1-7 on oxidative stress(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 120 min)).

2) GSH 함량 측정

85% aq. MeOH fraction에서 분리한 compound 1-7이 세포내의 GSH 함량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 thiol-staining reagent인 mBBr을 이용하여 측정하였다. 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 120 분 동안 처리 한 후, 측정하였다. sample을 처리하지 않은 blank와 비교 시, 분리된 모든 화합물에서 GSH의 함량이 증가된 것이 보였으며, compound 1이 그중 가장 높은 활성을 보였다. GSH의 함량 증가는 compound 3, compound 2, compound 6, compound 5에서 뚜렷한 증가를 보였다(Fig.58).

본 실험에서 분리된 화합물들은 모두 세포내의 GSH 함량의 증가에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

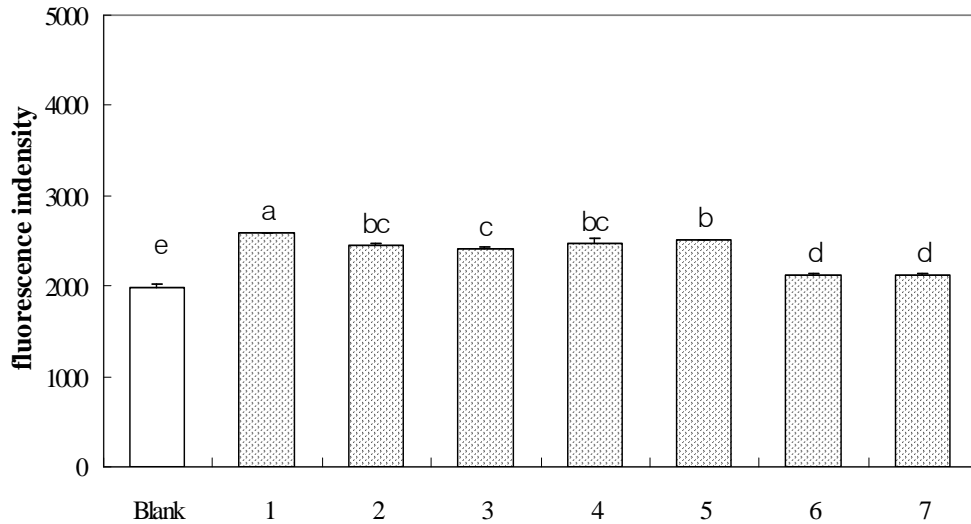


Fig. 58 Effect of compounds 1-7 from *Sagassum siliquastrm* on GSH level in HT1080 cell. (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 120 min))

3-4. 세포수준의 항비만 활성

(1) Glycerol 분비 및 Triglyceride 축적

1) 모자반의 분획별 효과

중성지방이 분해되면 지방산과 glycerol로 분해되므로 배지에 녹아있는 glycerol의 분비량과 세포 내에 축적되어 있는 중성지방(TG, triglyceride)양을 측정함으로써 모자반 시료처리에 의한 지방의 분해 정도를 알 수 있다. 따라서 모자반 유래 추출물 및 용매분획을 분화된 3T3-L1 지방세포에 2일간 시료처리 후 회수한 배양액으로부터는 세포 내에 분비된 glycerol 함량을 측정하였으며, 상층배양액을 제거하고 남은 세포를 이용하여 세포내의 중성지방(TG, triglyceride) 축적 정도를 측정하고 모자반의 항비만 활성을 검토하였다.

A+M 및 MeOH를 이용하여 추출한 조추출물을 분화된 3T3L1 지방세포에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각 well에 처리하여 glycerol 분비량을 측정한 결과 조추출물은 농도 의존적으로 glycerol 분비량을 증가시키는 경향을 보였으며, 반대로 세포에 축적된 TG 함량을 측정한 결과에서는 조추출물 농도 의존적으로 중성지방의 축적 정도를 감소시키는 경향을 보였다(Fig.59).

극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 얻은 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fractions를 이용하여 glycerol 분비 및 TG 축적에 미치는 영향을 검토하였다(Fig.60). 물층은 glycerol 분비 및 중성지방의 감소에 전혀 영향을 미치지 않았으나, 다른 분획물에서는 처리 농도 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 높은 중성지방의 감소 및 분해효과를 나타내었다. 세포내 TG의 분해능은 85% aq.MeOH, *n*-BuOH 및 *n*-Hexane 층에서 높게 나타났다. 이는 모자반 유래 분획물에 의해 중성지방이 glycerol과 지방산으로 분해되어 세포 내 중성지방의 함량을 감소시키는 것으로 사료되며 이들 분획물 유래 화합물에서도 중성지방 분해능을 가지는 항비만 활성이 기대된다.

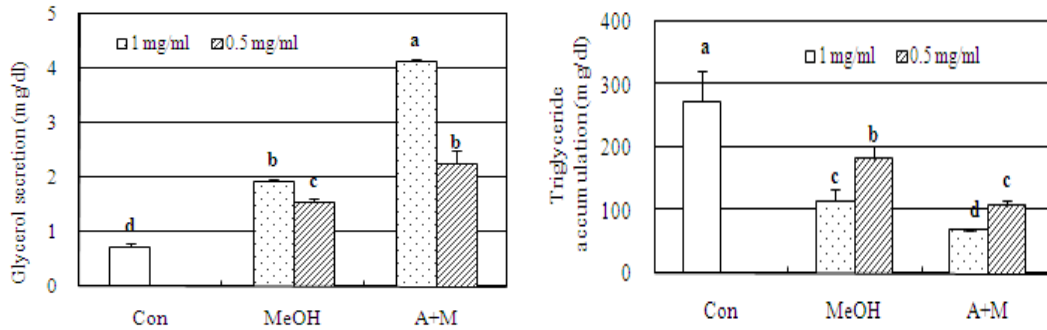


Fig. 59 Effect of crude extracts from *Sagassum siliquastrum* on glycerol secretions and triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

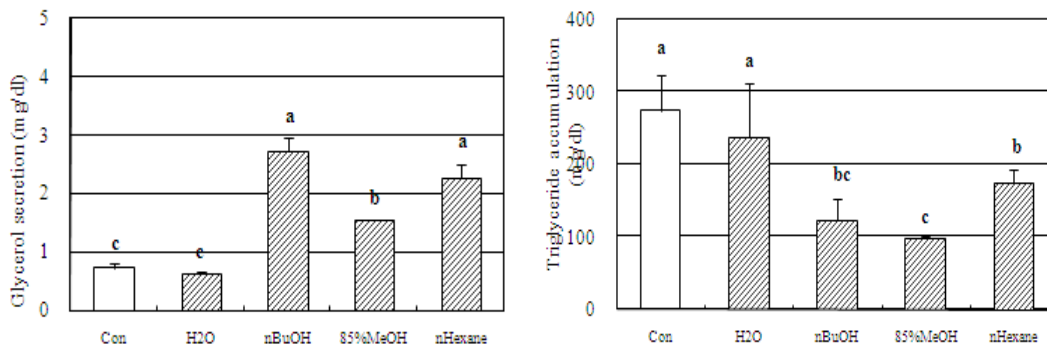


Fig. 60 Effect of its solvent fractions from *Sagassum siliquastrum* on glycerol secretions and triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

4. 요약 및 결론

우리나라의 경우 삼면이 바다로 둘러싸여 있는 지리적 특징과 해조류 양식 등을 통해 해조류 산업 발달의 조건을 갖추고 있을 뿐만 아니라, 우리나라 연안에 서식하는 해조류에 대한 천연물화학적 연구가 여전히 미흡하기 때문에 집중적인 연구를 수행할 경우, 우수한 생리활성물질을 얻을 수 있는 가능성은 상당히 높을 것으로 예상된다. 따라서 이러한 관점에서 우리나라 연안에 널리 서식하는 갈조류중의 하나인 파배기 모자반(*Sargassum siliquastrum*)을 채집하여 이 해조류가 만드는 이차 대사물질을 분리하고 여러 가지 생리활성 실험을 통하여 산업적 활용 가능성을 검토하였다.

먼저 제주도 해역에서 채집한 파배기 모자반을 CH₂Cl₂/acetone (1:1)와 MeOH의 용매로 각각 추출하여 두개의 조추출물을 얻었으며, 이를 혼합하여 극성순서에 따라 4개의 용매분획인 *n*-hexane, 85%aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 H₂O fraction을 각각 얻었다. 이들에 대한 DPPH radical 소거 활성과 peroxyntirite 소거 활성을 측정된 결과, 85%aq. MeOH fraction에서 가장 높은 소거 활성을 보였다.

이러한 활성검색 결과와 ¹H NMR 데이터 분석을 바탕으로 85% aq.MeOH fraction을 우선 연구대상 분획물로 선정하여 C18 flash column chromatography를 통해 7개로 나누었으며, 그중에서 80% aq.MeOH fraction과 90% aq.MeOH fraction을 HPLC와 prep. TLC를 이용하여 7개의 화합물을 분리하였다. compound 1, 2, 5 그리고 6은 알려진 chromanol 계열의 화합물이며, compound 4, 5 그리고 7은 chromanol 계열의 화합물으로써, 아직까지 보고되지 않은 새로운 화합물이다. 분리된 화합물 7개에 대한 DPPH radical과 Peroxynitrite 소거 활성을 측정된 결과 모든 화합물이 높은 활성을 보였다.

이를 바탕으로 HT1080 cell을 이용하여 항산화 실험을 측정하였다. ROS 소거 활성을 측정된 결과, 85% aq.MeOH fraction에서 가장 높은 활성을 보였으

며, *n*-BuOH, *n*-hexane fractions 순으로 높은 활성을 보였다. 그리고 DNA oxidation 측정 결과 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, *n*-hexane fractions이 DNA oxidation을 억제하는 것을 확인 할 수 있었으며, GSH 함량 또한 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 85% aq.MeOH로부터 얻어진 7개의 화합물에 대해서 도를 ROS 소거 활성과 GSH 함량을 측정한 결과 분리한 화합물 7개 모두 ROS 소거 활성을 보여주고, 세포내 GSH 함량을 증가 시키는 것을 확인 하였다. 따라서 분리된 7개의 화합물은 모두 항산화에 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

위 실험 결과, 본 연구에 사용된 파배기 모자반(*Sargassum siliquastrum*)은 세포내 존재하는 활성 산소 종을 직접적으로 제거하는 항산화제 기능 뿐만 아니라, 산화스트레스로 인한 세포 손상을 일으키는 DNA oxidation을 막는 것으로 확인 되었으며, 또한 세포내 항산화 방어 시스템 중 효소 역할을 하는 GSH 함량 또한 증가시키는 것으로 확인되었다. 분리된 화합물 7개 모두 지금까지 해조류에서 많이 분리되어진 chromanol 계통의 화합물으로써, 역시 높은 항산화 활성을 가지는 것이 확인되었다. 현재 85% aq.MeOH fraction에서만 화합물을 분리 하였으며, *n*-BuOH 과 *n*-hexane fractions 또한 분리 할 경우 높은 활성을 가지는 화합물이 나올 것으로 예상된다.

항비만 실험에서, 모자반 유래 분획추출물을 분화된 3T3-L1 지방세포에 처리 후 회수한 배양액 및 세포로부터 glycerol 분비량 및 세포내의 중성지방 (TG, triglyceride) 축적량을 측정하여 모자반의 항비만 활성을 검토한 결과, 물 층은 glycerol 분비 및 중성지방의 감소에 전혀 영향을 미치지 않았으나, 다른 분획물에서는 높은 중성지방의 감소 및 분해효과를 나타내었다. 세포내 TG 의 분해능은 85% aq.MeOH, *n*-BuOH 및 *n*-hexane fractions 에서 높게 나타났다. 이는 모자반 유래 분획물에 의해 중성지방이 glycerol과 지방산으로 분해 되어 세포 내 중성지방의 함량을 감소시키는 것으로 사료되며 이들 분획물에 함유된 화합물을 분리할 경우, 매우 높은 중성지방 분해능을 가지는 물질이 얻어질 것으로 기대된다.

5. 참고문헌

1. 김웅서(2005) '해양개발의 현재와 미래', 한국해양연구원.
2. P.J. Scheuer, ed. (1978) Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives, Academic Press, New York, Vol. I—V
3. 신재용 (1999) '약이 되고 궁합맞는 음식 동의보감', 학원사, 319-320
4. Ruperez, P. (2002) Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry* 79, 23-26.
5. Sanchez-Machado, D. I., J. Lopez-Cervantes, J. Lopez-Hernandez, and P. Paseiro-Losada. (2003) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry* 85(3), 439-444.
6. 강경금, 박난희, 김정목 (2004) 황 흡착 알긴산의 *Lactobacillus acidophilus* 성장에 미치는 영향 및 항 돌연변이 작용' 한국식품영양과학지, 33(4), 757-761
7. Bernardi G and Springer G. F. (1962) Properties of highly purified fucan. *J Biol Chem* 273, 75-81.
8. Yamamoto I., Nagumo T., Takahasi M., Fujihara M. and Suzuki Izima I. (1981) Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effects of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. *J Exp Med* 187-192.
9. 김장양, 원종훈 (1974) 수영만 양식 미역, 모자반 및 환경해주의 수근, 카드뮴, 납, 구리의 농도에 대하여, 한국수산학회지, Vol. 7, No3. 169-178
10. Jang K. H., Lee B. H., Choi B. W., Lee H. and Shin J. (2005) Chromenes from the Brown Alga *Sargassum siliquastrum*. *J. Nat. Prod.* 68(5), 716-723.
11. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 25, 1199-1200.
12. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman. (1994)

Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* 16, 149-156.

13. Okimotoa Y., Watanabea A., Nikia E, Yamashitab T., Noguchia N. (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474, 137-14.
14. Milne,L.,Nicotera, P., Orrenius, S., Burkitt, M. (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304, 102-109.
15. Poot M., Verkerk A., Koster J.F., Jongkind J.F. (1986) De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. *Biochim Biophys Acta.* 883, 580-584.
16. Green, H. and O. Kehinde. (1974b) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, 1, 113-116.