

Article

극지 홍조류 *Polysiphonia stricta*에서 분리된 methyl *trans*-aconitate
유도체들과 항산화 활성

이정임¹ · 공창숙³ · 백승오¹ · 서영완^{1,2*}

¹한국해양대학교 해양과학기술대학 해양환경·생명과학부
²한국해양대학교 해양과학기술전문대학원 해양과학기술융합학과
(606-791) 부산광역시 영도구 태종로 727
³신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과
(617-736) 부산광역시 사상구 백양대로 700번길

Isolation and Antioxidant Activity of Methyl Aconitates from
Arctic Red Alga *Polysiphonia stricta*

Jung Im Lee¹, Chang-Suk Kong³, Seung Oh Baek¹, and Youngwan Seo^{1,2*}

¹Division of Marine Environment & Bioscience, College of Maritime Sciences
Korea Maritime and Ocean University

²Department of Convergence Study on the Ocean Science and Technology
Ocean Science and Technology School, Korea Maritime and Ocean University
Busan 606-791, Korea

³Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Sciences
Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract : In our continuing study on the antioxidant activity of *Polysiphonia stricta*, its crude extract was fractionated into *n*-hexane, 85% aqueous methanol (85% aq.MeOH), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water fractions according to solvent polarity. The solvent fractions were evaluated for their potential to inhibit lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) production in HT 1080 cells. The *n*-BuOH fraction most strongly inhibited both lipid peroxidation and ROS production in HT 1080 cells. The *n*-BuOH fraction was further separated by repeated silica gel column chromatography and RP-HPLC to give methyl aconitates (2 and 3). The chemical structure of isolated compounds was determined by NMR spectral analysis.

Key words : *Polysiphonia stricta*, methyl aconitate, antioxidant activity

1. 서 론

인체는 생명유지에 필요한 에너지 생산을 위하여 호흡 대사 과정에서 끊임없이 산소를 필요로 하며 흡입한 산소 중 일부(약 2-3%)는 활성산소종(reactive oxygen species,

ROS)이라는 산화촉진물질(prooxidant)을 발생시킨다(Chai et al. 2006). 이러한 활성산소종은 체내에 적정량 존재할 때에는 생체방어 과정 중 하나로 병원체나 이물질에 대한 살균작용을 통해 병원체로부터 인체를 보호하는 작용을 하지만 과량 생성되면 체내에서 유해물질로서 작용하게 된다. 인체는 활성산소종이 유해물질로 작용할 때, 이를 제거하기 위한 방어 시스템으로 superoxide dismutase

*Corresponding author. E-mail : ywseo@kmou.ac.kr

(SOD), catalase, peroxidase 등과 같은 항산화 효소가 작용하게 되며, 또한 ascorbic acid, tocopherol, carotenoid 등과 같은 항산화 물질을 음식을 통하여 섭취함으로써 산화스트레스를 제거하는 방어기작을 가진다(Diplock et al. 1998). 따라서 활성산소종을 인체내에서 적절하게 유지하는 것이 매우 중요하며 다른 여러 요인들로 인하여 이러한 균형이 깨어지면 각종 질병을 일으키게 된다. 산화적 스트레스에 의해 과도하게 생성된 ROS는 단백질, 불포화 지방산 등과 결합하여 과산화지질을 생성하고, DNA나 RNA 등에 손상을 일으키며, 생체막의 손상, 면역력 저하와 함께 순환기장애, 파킨슨씨병, 당뇨병 등과 같은 여러 가지 질병과 염증 및 노화 더 나아가서는 암을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다(Halliwell 1996; Ichinose 2003). 이러한 이유로 인체내 활성산소종을 제거하고 생체 방어시스템을 지속시키는 항산화 물질이 필요하며 이를 찾는 연구가 계속되어져 왔다. 그 동안 널리 사용되어 온 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole(BHA)나 butylated hydroxytoluene(BHT)는 발암 및 독성의 유해성이 지적되고 있어 사용이 점차 줄어들고 있다(Zia-ur-Rehman 2006). 따라서 인공합성물이 아닌 천연자원에서 항산화제를 개발하려는 노력이 계속되었으며 이러한 연구의 일환으로 허브와 같은 식물로부터 항산화제를 개발하려는 연구가 많이 수행되었다(Yanishlieva et al. 2006).

북극의 해수는 빙하의 해빙으로 인해 염분의 변화가 심하고, 극한의 환경으로 수온이 낮아 일반 해수보다 더 많은 양의 산소를 포함하고 있으므로, 여기에 서식하는 해조류는 이런 독특한 환경에 적응하기 위한 강한 항산화물질을 가지고 있을 것으로 예상되며 이미 북극해에 서식하는 생물종이 온대지역에 서식하는 생물종보다 더 높은 항산화 능력을 가지고 있다는 연구 결과가 발표된 바 있다(Regoli et al. 2000; Silva et al. 2013).

본 연구팀은 북극 해조류에서 새로운 항산화제를 탐색하는 과정에 홍조류 *Polysiphonia stricta*의 추출물과 용매 분획물이 활성질소종인 peroxyinitrite에 대해 높은 소거효과를 보인다는 것을 이미 보고한 바 있다(Seo et al. 2007). 따라서 본 연구에서는 *P. stricta* 추출물의 용매 분획물에 대한 추가적인 항산화활성을 검색하고 분리정제 과정을 통해 항산화물질들(2-3)을 분리하고자 하였으며 또한 분리된 물질들의 유도체를 합성하여 화학구조와 생리활성간의 상관관계를 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

기기 및 시약

HPLC는 Dionex사의 P580 Pump를 중심으로 Varian RI detector와 YMC pack ODS-A (250 × 10 mm, S 5 μm,

12 mm) column을 사용하였다. 선광도는 MeOH 용매로 polarimeter(ATAGO, POLAX-2L)를 사용하여 측정하였다. 분리한 화합물의 구조를 동정하기 위하여 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. 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) 등을 사용하여 시료를 추출하였다.

Column packing materials는 RP 18(YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μm), Silica gel(silica gel 60, 0.063 ~ 0.200 mm, Merck), Sephadex LH-20(bead size 25 ~ 100 μm, Sigma)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F_{254s} (0.5 mm, Merck), spray reagent는 절대 알코올에 녹인 5% H₂SO₄를 사용하였다. NMR 측정에 사용한 용매는 CD₃OD(Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)이다. L-Ascorbic acid, penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid), dihydro-rhodamine 123(DHR 123)과 3-morpholinsydnominine(SIN-1)는 Sigma사(St Louis, MO, USA), peroxyinitrite(ONOO⁻)는 Cayman(Ann Arbor, MI, USA), DMSO(Dimethyl sulfoxide)는 Junsei에서 구입하였으며, 그 외 ethanol, methanol, acetone과 methylene chloride는 Junsei사의 일 급시약을 증류하여 사용하였다.

시료의 채집, 추출 및 물질분리

해조시료는 2005년 6월 중순경 노르웨이령 스발바드 군도(Svalbard Islands) 근해에서 채집하였으며 건조기를 사용하여 건조하여 냉동보관하였다. 냉동보관한 시료(50 g)를 해빙하여 수돗물로 3번 세척하고 증류수로 한 번 씻은 후에 잘게 잘라 methylene chloride와 acetone의 1:1 혼합용매에 잠기도록 하여 24시간동안 방치한 후 여과하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40°C에서 vacuum rotary evaporator로 농축하여 혼합용매의 추출물을 얻었다. 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 2회 반복하여 methanol 추출물을 얻은 후에 위의 추출물과 합하였다.

합해진 추출물(5.18 g)을 methylene chloride와 water로 분획하였으며 분리한 methylene chloride 분획은 다시 *n*-hexane과 85% 메탄올 수용액층(85% aq.MeOH)으로 분배하였다. 앞에서 분리되었던 water 분획층은 다시 *n*-butanol(*n*-BuOH)과 water로 분배하여 *n*-hexane(0.38 g), 85% aq.MeOH(0.80 g), *n*-BuOH(0.38 g), water(1.98 g) 층의 모두 4개의 분획을 얻었다.

항산화 활성이 좋은 *n*-BuOH 층에 대한 C₁₈ flash column chromatography를 수행하여 총 7개의 분획(rfc1-

rfc7)을 얻었으며, 각각의 이동상으로 50, 60, 70, 80, 90% aq.MeOH, 100% MeOH 그리고 100% EtOAc가 사용되었다. 그 중에 50% aq.MeOH 분획(rfc1)에 대해서 reversed-phase HPLC(YMC ODS-A, 35% aq.MeOH, 2 mL/min)를 수행하였으며, retention time 10분과 14분에서 순수한 화합물 2와 3이 분리되었다.

Methyl *trans*-aconitate 유도체들의 합성

동근 플라스크에 200 mg의 *trans*-aconitic acid와 과량의 methanol을 첨가 한 후에 촉매제로서 진한 황산을 1-2 방울 첨가하였다. 환류 장치를 이용하여 3시간 동안 반응시켰으며, 반응 후에 N₂ gas를 이용하여 용매를 제거하였다. 반응혼합물(300 mg)은 35% aq. MeOH 용액을 용리용매로 이용하여 역상 HPLC(YMC ODS-A, 2 mL/min)를 수행하였으며, retention time 9분, 12분, 15분, 20분, 41분에서 순수한 화합물 5개가 분리되었다. Retention time 9분과 12분에서 얻어진 화합물과 동일한 화합물인 2(125.3 mg)와 3(18.5 mg)이 얻어 졌으며 15분과 20분에서 5,6-*O*-dimethyl *trans*-aconitate(4, 27.9 mg)와 1,5-*O*-dimethyl *trans*-aconitate(5, 133.0 mg), 41분에서 1,5,6-*O*-trimethyl *trans*-aconitate(6, 8.9 mg)가 분리되었다.

세포배양

마우스 대식세포 Raw 264.7는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Utah, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone, Utah, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 세포 배양은 2일 간격으로 배지를 교환하였으며, 6~7일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

세포생존율 측정

염주괴불주머니의 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Hansen et al. 1989). MTT assay는 생존 암세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase의 효소작용에 의해 황색의 수용성 물질인 MTT가 환원되어 dark blue formazan crystal로 생성하는 원리를 이용한 실험법으로, formazan crystal이 침전되는 정도를 흡광도로 측정함으로써 세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정할 수 있다(Hansen et al. 1989). 배양된 세포는 well당 2 × 10⁴ cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 180 µL와 일정농도의 시료 20 µL(10% aq. DMSO)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered

saline(PBS) 20 µL를 첨가하였다. 48시간 배양 후 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액 20 µL를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다(Park et al. 1990). 이때 생성된 formazan결정을 DMSO에 녹여서 ELISA reader(Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율(%)을 구하였다.

ROS (reactive oxygen species) 소거능 측정

세포내 reactive oxygen species(ROS) 함량은 DCF-DA assay로 측정하였다(Okimoto et al. 2000). DCF-DA (fluorescence probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate)는 세포내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 DCF-DA를 세포에 처리하여 발생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. Raw 264.7 세포를 96 well에 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 20 µM DCF-DA를 각 well에 처리하여 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 1시간 incubation 한 후, DCF-DA를 제거하고 500 µM H₂O₂를 처리하여 시간별로 λ_{excitation} 485 nm, λ_{emission} 530 nm에서 DCF fluorescence를 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT(BioTEK instruments, USA)로 측정하였다.

Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하여 분석하였다(Kooy et al. 1994). DHR 123을 dimethylformamide로 녹여서 5 mM stock 용액을 만들고, 질소로 purge하여 -80°C에 보관하였다. 50 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합한 pH 7.4의 buffer와 100 µM DTPA(diethylenetriamine pentaacetic acid)를 혼합하여 DHR 123을 5 µM로 희석하여 사용하였다. 이 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT를 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 SIN-1에 의한 산화가 DHR 123에 의한 산화와는 달리 점진적으로 일어나기 때문에 동일한 방법으로 실시하되 실온에서 방치하는 시간만 1시간으로 조절하여 측정하였다. 대조군으로는 시료를 제외하고 peroxynitrite를 처리한 control과 모두 다 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

지질과산화(lipid peroxidation) 억제

지질과산화물의 생성은 thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS) 방법을 응용하여 측정하였다(Heath and Packer 1968). 200 μ L의 PBS-suspended Raw 264.7 세포를 각 농도별로 시료를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10분간 배양하였다. 세포 내 산화를 유도하기 위하여 2 mM H₂O₂와 0.1 M FeSO₄를 처리한 후 37°C에서 10분간 반응시킨다. 반응 후, trichloroacetic acid (TCA, 10% w/v)를 처리하여 산화를 중지시키고, 동량의 TBA(1% w/v)를 첨가하여 90°C에서 30분 동안 반응시킨다. 실온에서 냉각시킨 혼합액을 원심분리 후 528 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 제외하고 2 mM H₂O₂(100 μ L)와 0.1 M FeSO₄(100 μ L)를 처리한 control과 시료, 2 mM H₂O₂, 0.1 M FeSO₄ 모두 다 처리하지 않고 물 100 μ L만 첨가한 blank를 사용하였다.

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(Mean) \pm 표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System(v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

3. 결과 및 고찰

Polysiphonia stricta로부터 분리된 화합물의 구조결정

극지해조류 *P. stricta*의 *n*-BuOH 분획으로부터 2개의 화합물 **2**와 **3**이 분리되었다. 분리된 화합물들의 화학구조는 1D NMR(¹H, ¹³C, DEPT)과 2D NMR(¹H COSY, TOCSY, gHMBC, gHMBC) 실험을 통하여 결정되었다. 화합물 **2**와 **3**은 무색의 oil 형태로 분리되었으며, Mass spectrum과 ¹³C NMR spectrum을 통해 분자식이 C₇H₈O₆인 것으로 결정되어 결과적으로 두 화합물이 같은 분자량을 가지는 구조 이성질체라는 것이 확인되었다.

화합물 **2**의 ¹H NMR 스펙트럼을 분석한 결과 각각 δ 6.89(H-2)에서 methine peak, δ 3.88(H-4)에서 methylene peak, δ 3.76에서 methoxy group의 methyl peak가 관찰되었다. ¹³C NMR 스펙트럼에서는 δ 173.5(C-5), 168.7(C-6), 167.1(C-1)에서 carbonyl carbon peak가 관찰되었으며 δ 142.2(C-3)에서 quaternary carbon peak와 129.1(C-2)에서 methine carbon peak가 나타나 화합물 내에 이중결합이 하나 존재한다는 것을 보여주었다. 또한 upfield 영역의 δ 52.4(C-1)과 δ 33.8(C-4)에서 각각 methoxy carbon

과 allylic carbon의 존재가 확인되었다.

gHMBC 실험에서 δ 3.76(C-5-OCH₃)의 methyl 수소와 δ 167.1(C-1)의 탄소 사이에 강한 correlation이 관찰됨으로써 δ 167.1(C-1)의 탄소는 methyl이 결합된 methyl ester임을 확인할 수 있었다. δ 3.88(H-4)의 수소신호는 δ 142.2(C-3)와 129.1(C-2)의 탄소신호와 long-ranged coupling이 관찰됨으로써 allylic position에 위치한 methylene임이 확인되었으며, 또한 δ 3.88 (H-4)의 수소신호가 δ 173.5 (C-5)과 168.7(C-6)의 탄소신호에 correlation을 보임으로써 allylic carbon(C-4)에 인접한 위치에 두 개의 carbonyl carbon [δ 173.5(C-5)과 168.7(C-6)]이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이 뿐만 아니라 δ 6.89(H-2)의 수소신호와 δ 168.7(C-6)의 탄소신호 사이에도 long-ranged coupling이 관찰되었다. 이러한 실험결과를 분석한 결과 화합물 **2**의 화학구조는 *trans*-aconitic acid의 메틸에스터인 1-*O*-methyl *trans*-aconitate로 결정되었다(Fig. 1).

3의 ¹H NMR 스펙트럼도 **2**와 거의 유사하였으나, **2**의 δ 3.76(C-1)에 나타난 methoxy 수소에 대응하는 신호가 **3**에서는 δ 3.66(C-5)에서 관찰되었다. ¹³C NMR 스펙트럼에서도 C-3(δ 142.2)와 C-2(δ 129.1)을 포함하여 다른 탄소 신호들의 chemical shift 값이 약간씩 이동하여 **2**와 다른 물질임을 보여 주었다. 가장 뚜렷한 차이점은 **2**의 gHMBC에서 δ 3.76(C-1-OCH₃)의 methyl 수소신호와 δ 167.2(C1)의 탄소신호 사이에 관찰되었던 강한 correlation이 사라지고 화합물 **3**에서는 δ 3.66(C-5-OCH₃)의 methyl 수소신호와 δ 172.1(C-5)의 탄소신호 사이에 강한 correlation이 관찰되었다. 따라서 이러한 모든 실험결과에 부합하는 화합물 **3**의 화학구조는 C-5의 carboxylic acid 작용기에 methyl기가 ester 형태로 결합한 5-*O*-methyl *trans*-aconitate임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 분리된 두 화합물(**2-3**)의 화학구조 및 이중결합의 배열은 *trans*-aconitic acid로부터 에스테르화반응을 통하여 화합물 **2**와 **3**을 합성한 후에 얻어진 NMR 데이터와도 잘 일치하였다. 모든 *trans*-aconitic acid 유도체들(**2-6**)에 존재하는 수소와 탄소의 화학적 이동값은 2D NMR 실험을 통하여 정확하게 결정되었다(Table 1과 2).

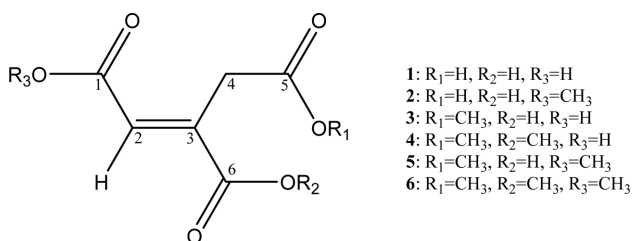


Fig. 1. Chemical structure of compounds (**2-3**) isolated from *Polysiphonia stricta* and synthetic derivatives (**4-6**) of *trans*-aconitic acid

Table 1. ^1H spectral data for compounds 2-6

No	^1H chemical shift (δ , ppm)				
	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-
2	6.89 (s, 1H)	6.89 (s, 1H)	6.89 (s, 1H)	6.90 (s, 1H)	6.90 (s, 1H)
3					
4	3.88 (s, 2H)	3.88 (s, 2H)	3.90 (s, 2H)	3.89 (s, 2H)	3.92 (s, 2H)
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
C1-OMe	3.76 (s, 3H)			3.75 (s, 3H)	3.76 (s, 3H)
C5-OMe		3.66 (s, 3H)	3.66 (s, 3H)	3.66 (s, 3H)	3.67 (s, 3H)
C6-OMe	-	-	3.79 (s, 3H)		3.80 (s, 3H)

Measured in CD_3OD at 300 MHz. Assignments were aided by DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 2. ^{13}C NMR spectral data for compounds 2-6

No	^{13}C chemical shift (δ , ppm)				
	2	3	4	5	6
1	167.2	168.3	167.8	167.0	166.8
2	129.1	130.7	131.2	129.4	129.7
3	142.2	141.0	139.9	141.7	140.9
4	33.9	33.7	33.6	33.7	33.7
5	173.5	172.1	172.1	172.1	171.9
6	168.8	169.0	168.0	168.5	167.5
C1-OMe	52.4			52.5	52.5
C5-OMe		52.5	53.3	52.6	53.5
C6-OMe	-	-	52.6		52.6

Measured in CD_3OD at 75 MHz. Assignments were aided by DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Intracellular ROS 소거활성

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)가 세포내 활성 산소와 반응해 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 세포내에 존재하는 활성 산소종을 측정하였다. 세포 내 자유라디칼 생성은 H_2O_2 를 이용하여 유도하였으며, 30분 간격으로 120분 동안 형광 정도를 측정하여 나타내었다. 대조군은 시료를 제외하고 500 μM H_2O_2 만 처리한 control과 시료와 H_2O_2 모두 다 처리하지 않은 blank를 사용하였다. Control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 계속 증가하는 반면에, blank의 경우 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다. 홍조류 *P. stricta* 추출물의 용매분획물(water, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 층)이 가지는 intracellular ROS 소거능을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 측정한 결과 모두 농도 의존적으로 ROS를 소거하는 것이 확인되었다. 용매분획층중에서 *n*-BuOH 층이 가장 좋은 활성을 나타내어 100과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 control과 비교할 때 90% 이상의 높은 소거능을 보여 주었는데, 이는 H_2O_2 를 처리하지

않은 blank와 거의 상응하는 효과를 나타내었다. 그리고 85% aq. MeOH과 water 층은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 30% 이상의 ROS 소거능을 나타내었으며 *n*-hexane 층은 거의 소거능을 보여 주지 않았다(Fig. 2).

TBARS법을 이용한 lipid peroxidation 측정

Raw 264.7 세포에서 *P. stricta* 추출물의 용매분획물을 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 TBARS 법을 이용하여 lipid peroxidation 정도를 측정하였다. 측정 결과, *n*-BuOH 층에서 가장 높은 지질 과산화억제 효과를 보여 주었으며 특히, 100 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 50% 가량의 산화억제 효과를 나타내었다(Fig. 3).

Methyl trans-aconitate 유도체들(2-6)의 항산화 활성

본 실험에서는 홍조류 *P. stricta*에서 분리된 화합물 2와 3의 항산화 및 이들의 유도체들을 합성하여 화학구조적 차이에 따른 활성효과를 알아보고자 하였다. Peroxynitrite 소거효과를 측정한 결과, 100 μM 농도에서 2는 authentic

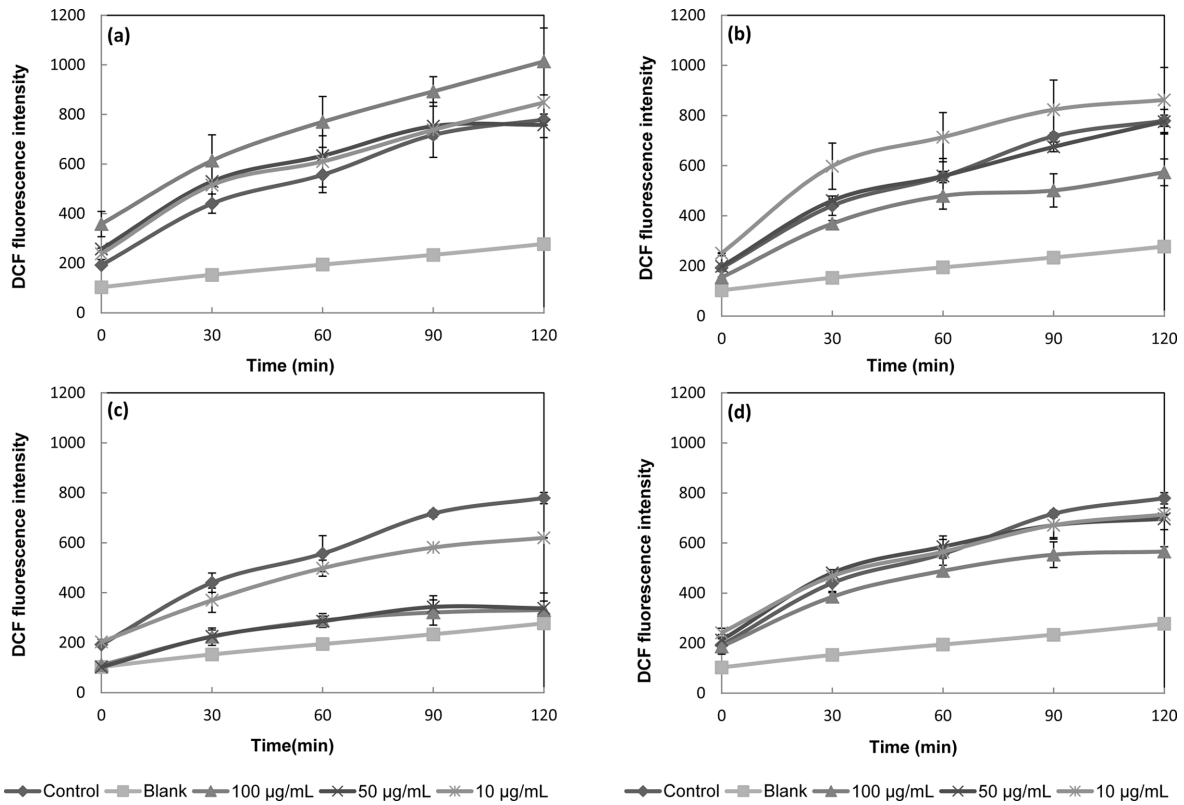


Fig. 2. Scavenging effects of solvent fractions from crude extract of *Polysiphonia stricta* on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. (a) *n*-Hexane, (b) 85% aqueous methanol, (c) *n*-BuOH, (d) Water

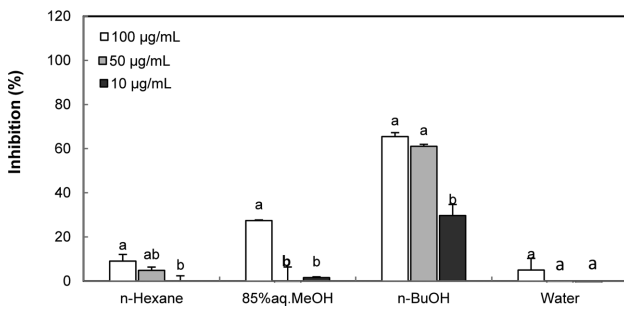


Fig. 3. Inhibitory effect of solvent fractions from crude extract of *Polysiphonia stricta* on membrane lipid peroxidation. ^{a-b}Means with different letters in each sample are significantly different ($p < 0.05$) based on Duncan's multiple range test

ONOO⁻와 SIN-1에 기인한 ONOO⁻를 각각 20%, 40% 정도 소거하는 것으로 나타났다. 반면에 화합물 3은 2에 비해 효과가 다소 감소하는 것을 확인하였으며, 화합물 1 (*trans*-aconitic acid)의 경우에는 소거효과가 거의 나타나지 않았다. 아코니트산(1)의 합성유도체들인 4, 5, 6의 경

우에, 100 µM 농도에서 화합물 6이 35% 이상 authentic ONOO⁻를 감소시키는 것으로 나타났으며, 다음으로 화합물 4가 20% 정도 소거하는 것으로 나타났다. SIN-1에서 기인한 ONOO⁻의 소거활성의 경우에는, 화합물 6이 50 µM 농도에서 약 80%의 소거 효과를 보였으며, 화합물 4 또한 약 50%의 소거활성을 보여주었다. ONOO⁻ 측정 결과 methyl group이 치환되지 않은 *trans*-aconitic acid 보다는 methyl기로 에스터화된 화합물이 항산화 효과가 증가되는 경향을 보였으나 C-5의 카복실기가 methyl ester가 되면 항산화 활성이 증가되지 않았으며 C-6의 카복실기가 methyl ester가 되었을 때 항산화활성이 팔목하게 증가되어 3개의 카복실기 모두가 methyl기로 에스터화된 화합물 6이 가장 높은 ONOO⁻ 소거 활성을 보여주었다. 홍조류 *P. polysiphonia* 추출물의 용매분획들중 *n*-BuOH 분획층이 lipid peroxidation 억제와 intracellular ROS 소거에도 좋은 활성을 나타내었기 때문에 *n*-BuOH 분획에서 분리된 methyl *trans*-aconitates 및 그 합성유도체들도 좋은 활성을 보일 것으로 기대되었으나 유의할 만한 활성을 보여 주지는 못하였다.

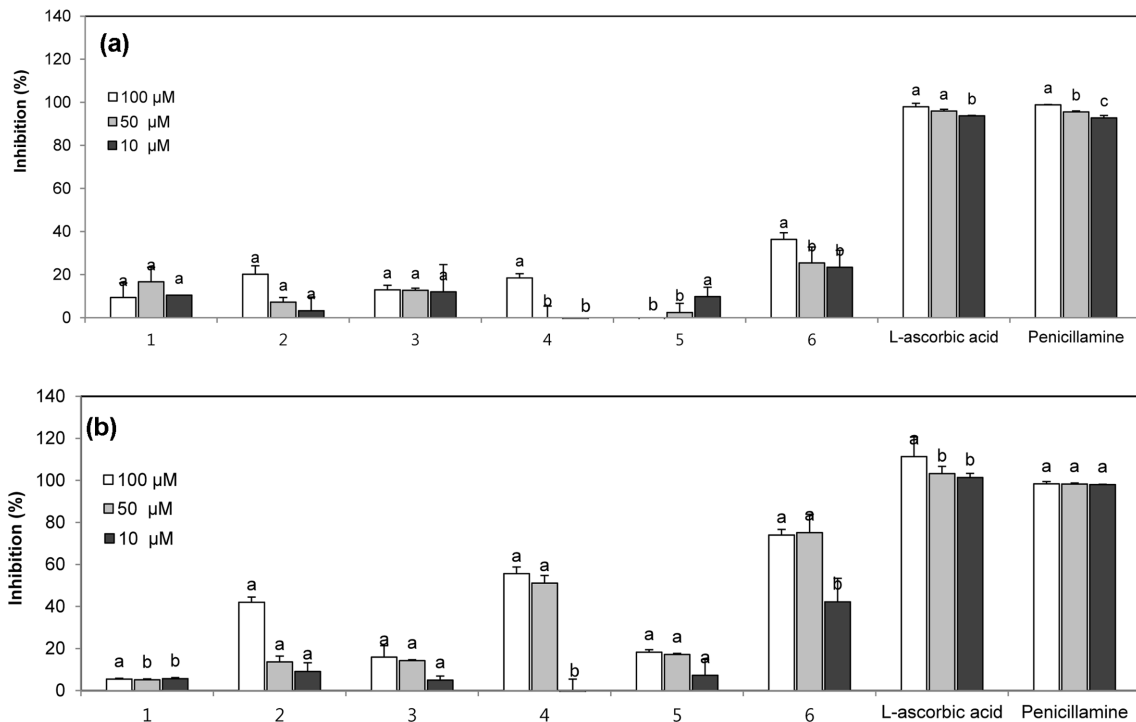


Fig. 4. Peroxynitrite scavenging activity of compounds 1-6. (a) Authentic peroxynitrite, (b) Peroxynitrite from decomposition of SIN-1. ^{a-b}Means with different letters in each sample are significantly different ($p < 0.05$) based on Duncan's multiple range test

4. 결 론

이상의 결과들로부터 극지 홍조류 *P. polysiphonia*은 이미 보고된 바 있는(Seo et al. 2007) peroxynitrite 소거활성 뿐만 아니라 지질과산화물을 억제하고 생체내 산화 스트레스로 인해 생성되는 라디칼도 활발히 소거함으로써 세포의 산화적 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 추출물의 용매분획들중에 *n*-BuOH 분획층이 가장 우수한 항산화 활성을 나타내어 이 분획으로부터 항산화활성 분리를 시도하여 두 개의 methyl *trans*-aconitate 유도체들인 1-*O*-methyl-*trans*-aconitate(2)와 5-*O*-methyl-*trans*-aconitate(3)를 분리하였다. 이 화합물들은 *trans*-aconitic acid의 methyl ester 유도체들로서 서로 구조 이성질체 관계인 화합물들이다. Methyl *trans*-aconitate들인 화합물 2와 3은 해조류는 물론이고 아직까지 어떠한 해양생물에서도 분리되지 않았으며 여기에서 처음으로 보고되어 진다. 단지 최근에 홍조류 *Symphocladia latiuscula*로부터 이들의 이성질체인 6-*O*-Methyl *trans*-aconitate가 분리된 바 있다(Xu et al. 2012). 또한 본 연구에서 처음으로 2-D NMR 실험을 통하여 여러 가지 methyl *trans*-aconitate 유도체들의 수소와 탄소에 대한 정확한 NMR chemical shift 값을 결정하였다(Table 1과 2).

cis-Aconitic acid는 생체내 TCA 회로에서 시트르산(citric acid)에서 아이소시트르산(isocitric acid)으로 전환될 때 중간물질로서 작용한다. *trans*-Aconitic acid는 리슈마니아증을 일으키는 원생동물 *Leishmania donovani*을 억제하는 것으로 알려져 있고(Misra et al. 1989) 또 밀(*Triticum aestivum*)로부터 분리된 5,6-*O*-dimethyl *trans*-aconitate(4)가 식물이 곰팡이에 공격받으면 생성되는 물질인 phytoalexin으로서 미생물의 침입에 대한 식물체의 방어 기전의 일환으로 작용하는 것으로 보고된 바 있으나(Rémus-Borel et al. 2006, 2009) *trans*-aconitic acid 유도체들의 다른 활성에 대해서는 별로 알려지지 않았다. 이미 위에서 언급한 대로 홍조류 *P. polysiphonia*에서 분리된 methyl aconitate 유도체들은 유의적인 peroxynitrite (ONOO⁻) 소거활성을 보여 주었으며 특히 합성유도체인 화합물 6은 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대해서 매우 좋은 활성을 보여 주었다. 하지만 peroxynitrite를 제외한 다른 항산화 활성에 대해서는 그렇게 유의적인 항산화 활성을 보여주지는 못하였기 때문에 이 화합물들을 제외한 다른 항산화물질들이 존재할 것으로 판단되었으나 제한된 양으로 인하여 순수하게 분리하지는 못하였다. 추후 시료의 추가채집을 통하여 또 다른 종류의 항산화물질들을 분리할 예정이다.

사 사

본 연구는 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

참고문헌

- Chai Y, Niu L, Sun XL, Ding JH, Hu G (2006) Iptakalim protects PC12 cells against H₂O₂-induced oxidative injury via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* **350**:307-314
- Diplock AT, Charleus JL, Crozier-willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit J Nutr* **80**:S77-S112
- Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* **16**:33-50
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**:203-221
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **125**:189-198
- Ichinose M (2003) Inflammatory mechanisms in bronchial asthma and COPD. *Tohoku J Exper Med* **200**:1-6
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **16**:149-156
- Misra S, Sanyal T, Sarkar D, Bhattacharya PK, Ghosh DK (1989) Evaluation of antileishmanial activity of *trans*-aconitic acid. *Biochem Med Metab Biol* **42**:171-178
- Okimoto Y, Watanabe A, Niki E, Yamashita T, Noguchi N (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett* **474**:137-140
- Regoli F, Nigro M, Bompadre S, Winston G (2000) Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquat Toxicol* **49**:13-25
- Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR (2009) Aconitate and methyl aconitate are modulated by silicon in powdery mildew-infected wheat plants. *J Plant Physiol* **166**:1413-1422
- Rémus-Borel W, Shallow N, McNally DJ, Labbé C, Bélanger RR (2006) High-speed counter-current chromatography for the study of defense metabolites in wheat Characterization of 5,6-*O*-methyl *trans*-aconitic acid. *J Chromatogr A* **1121**:200-208
- Seo Y, Lee HJ, Kim YA, Lee JI, Kim JH, Chung H, Kang SH (2007) *In vitro* peroxynitrite scavenging activity of arctic seaweed extracts. *Ocean and Polar Res* **29**:187-191
- Silva ALP, Holmstrup M, Amorim MJB (2013) Worms from the Arctic are better adapted to freezing and high salinity than worms from temperate regions: Oxidative stress responses in *Enchytraeus albidus*. *Comp Biochem Phys A* **166**:582-589
- Xu X, Piggott AM, Yin L, Capon RJ, Song F (2012) Symphyocladins A-G: Bromophenol adducts from a Chinese marine red alga, *Symphyocladia latiuscula*. *Tetrahedron Lett* **53**:2103-2106
- Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J (2006) Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur J Lipid Sci Technol* **108**:776-793
- Zia-ur-Rehman (2006) Citrus peel extract – a natural source of antioxidant. *Food Chem* **99**:450-454

Received Aug. 27, 2014

Revised Sep. 12, 2014

Accepted Sep. 17, 2014