



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 박사 학 위 논 문

곰피 플로로탄닌 성분의 콜린 에스테라제와
렌즈 알도즈 리닥타제 저해작용과
타크린 유도 간독성 및 고지혈증 모델
흰쥐에 대한 보호효과



2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

윤나영

이 학 박사 학 위 논 문

곰피 플로로탄닌 성분의 콜린 에스테라제와
렌즈 알도즈 리닥타제 저해작용과
타크린 유도 간독성 및 고지혈증 모델
흰쥐에 대한 보호효과

지도교수 최재수

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함



2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

윤나영

윤나영의 이학박사 학위논문을 인준함

2008년 2월 일



주 심	이학박사	최진호	인
위 원	이학박사	류은순	인
위 원	이학박사	김형락	인
위 원	약학박사	하배진	인
위 원	약학박사	최재수	인

목 차

LIST OF SCHEMES	i
LIST OF TABLES	ii
LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	v
LIST OF SYMBOLS	vi
ABSTRACT	1
I. 서론	5
II. 재료 및 실험방법	23
1. 재료	23
2. 시약 및 기기	23
2-1. 시약	23
2-2. 실험동물	24
2-3. 기기	24
3. 실험방법	25
3-1. 추출 및 분획	25
3-2. 활성성분 분리	27
3-2-1. <i>n</i> -Hexane 획분의 활성성분 분리	27
3-2-2. EtOAc 획분의 활성성분 분리	27
3-3. 곰피에서 분리된 화합물 1-12 의 분광학적 성질	31
3-4. 생리활성 실험	37
3-4-1. <i>in vitro</i> 실험	37
3-4-1-1. Cholinesterase 억제활성 실험	37

3-4-1-2. Lens aldose reductase 억제활성 실험	41
3-4-1-3. 간보호 활성 실험	44
3-4-2. <i>in vivo</i> 실험	47
3-4-2-1. 고지혈증 억제활성 실험	47
3-4-2-1-1. 실험동물	47
3-4-2-1-2. Poloxamer 407로 유발한 고지혈증 모델 흰쥐	47
3-4-2-1-3. 고콜레스테롤 식이로 유발한 고콜레스테롤혈증 모델 흰쥐	47
3-4-2-1-4. 혈액채취	48
3-4-2-1-5. 생화학 활성실험	48
3-4-2-1-5-1. 총 콜레스테롤 농도 측정	48
3-4-2-1-5-2. 중성지질 농도 측정	48
3-4-2-1-5-3. HDL 콜레스테롤 농도 측정	49
3-4-2-1-5-4. LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화지수 (A.I.)	49
3-4-2-1-6. 통계처리	50
III. 결과 및 고찰	51
1. 곰피에서 분리된 화합물의 구조 결정	51
1-1. <i>n</i> -Hexane 희분에서 분리된 화합물의 구조 결정	51
1-2. EtOAc 희분에서 분리된 화합물의 구조 결정	52
2. 생리활성 실험	67
2-1. <i>in vitro</i> 실험	67
2-1-1. 해조류 ethanol 추출물의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성 검색	67
2-1-2. 곰피의 ethanol 추출물과 각 분획물들의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성	70

2-1-3. 분리된 화합물의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성 -----	73
2-2. <i>in vivo</i> 실험 -----	78
2-2-1. 곰피의 추출물 및 극성 분획물의 고지혈증 억제활성 ----	78
2-2-2. 곰피로 분리된 화합물의 고지혈증 억제활성 -----	80
IV. 요약 및 결론 -----	86
V. 참고문헌 -----	90
감사의 글	



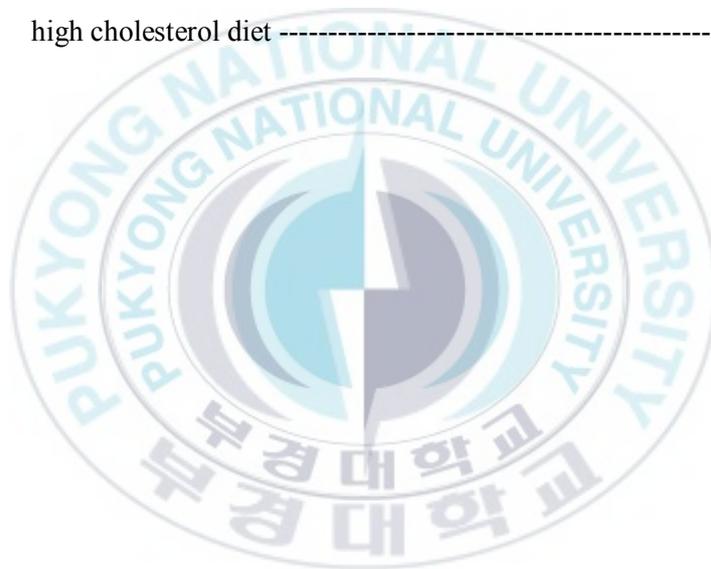
List of schemes

Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of <i>Ecklonia stolonifera</i> . -----	26
Scheme 2. Isolation of compounds 1 and 2 from the <i>n</i> -hexane fraction of <i>Ecklonia stolonifera</i> . -----	29
Scheme 3. Isolation of compounds 3-12 from the EtOAc fraction of <i>Ecklonia stolonifera</i> . -----	30
Scheme 4. Measurement of cholinesterase inhibitory activity. -----	40
Scheme 5. Measurement of lens aldose reductase inhibitory activity. -----	43
Scheme 6. Measurement of hepatoprotective activity. -----	46



LIST OF TABLES

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound 12 in $\text{DMSO-}d_6$ -----	66
Table 2. <i>in vitro</i> activities of ethanolic extract of Korean seaplant -----	69
Table 3. <i>in vitro</i> activities of the ethanolic extract and its fractions obtained from the ethanolic extract of <i>Ecklonia stolonifera</i> -----	72
Table 4. <i>in vitro</i> activities of compounds isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> ----	77
Table 5. Effect of the EtOH extract and its polar fractions on serum levels in poloxamer 407 induced hyperlipidemic rats -----	80
Table 6. Effect of eckol and dieckol isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> on serum levels in poloxamer 407 induced hyperlipidemic rats -----	84
Table 7. Effect of dieckol isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> on serum levels in rats fed a high cholesterol diet -----	85



LIST OF FIGURES

Fig. 1. Mechanism of acetylcholinesterase. -----	12
Fig. 2. Mechanism of diabetic complication: polyol pathway. -----	15
Fig. 3. Mechanism of tacrine-induced hepatotoxicity. -----	19
Fig. 4. Structures of the compounds 1 and 2 isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> . -----	34
Fig. 5. Structures of the compounds 3-7 isolated from <i>Ecklonia. Stolonifera</i> . -----	35
Fig. 6. Structures of the compounds 8-12 first isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> . -----	36
Fig. 7. Mechanism of the cholinesterase assay. -----	39
Fig. 8. Mechanism of the lens aldose reductase assay. -----	42
Fig. 9. Mechanism of the MTT assay. -----	45
Fig. 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 8 in DMSO- <i>d</i> ₆ .-----	57
Fig. 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 8 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	57
Fig. 12. HMBC spectrum of compound 8 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	58
Fig. 13. ¹ H-NMR spectrum of compound 9 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	59
Fig. 14. ¹³ C-NMR spectrum of compound 9 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	59
Fig. 15. HMQC spectrum of compound 9 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	60
Fig. 16. HMBC spectrum of compound 9 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	60
Fig. 17. ¹ H-NMR spectrum of compound 10 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	61
Fig. 18. ¹³ C-NMR spectrum of compound 10 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	61
Fig. 19. ¹ H-NMR spectrum of compound 11 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	62
Fig. 20. ¹³ C-NMR spectrum of compound 11 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	62
Fig. 21. HMBC spectrum of compound 11 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	63
Fig. 22. ¹ H-NMR spectrum of compound 12 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	64
Fig. 23. ¹³ C-NMR spectrum of compound 12 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	64
Fig. 24. HMQC spectrum of compound 12 in DMSO- <i>d</i> ₆ . -----	65

Fig. 25. HMBC spectrum of compound **12** in DMSO- d_6 . ----- 65



ABBREVIATIONS

CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C-NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	: deuterium dimethyl sulfoxide
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC ₅₀	: 50% effective concentration
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 coherence
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
TLC	: thin layer chromatography
UV	: Ultraviolet

LIST OF SYMBOLS

J	Coupling constant (Hz)
δ	Chemical shift



**Cholinesterase and lens aldose reductase inhibitory activities of
phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* and their protective
effects on tacrine-induced hepatotoxicity and hyperlipidemic rat
models**

Na-Young Yoon

***Department of Food and Life Science, Graduate School,
Pukyong National University***

Abstract

Ecklonia stolonifera OKAMURA is a perennial brown alga, belonging to the family Laminariaceae. It is frequently used as a foodstuff, along with *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. This alga was found to have antioxidant, antimutagenic activities and feeding-deterrent effect. The beneficial effects of *E. stolonifera* are thought to be due to its phlorotannin constituents. Phlorotannins, phenolic secondary metabolites of brown algae, are produced entirely by polymerization of phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Recently, phlorotannins have been shown to have many positive physiological effects including potent feeding deterrent, nitrite-scavenging, antimutagenic, antioxidant, antidiabetic complication, tyrosinase inhibitory, angiotensin-converting enzyme inhibitory, algicidal, antiallergic, antiviral and anti-skin aging activities. However, cholinesterase and lens aldose reductase inhibitory activities of phlorotannins from *E. stolonifera* and their protective effects on tacrine-induced hepatotoxicity and

hyperlipidemic rat models had not been investigated. The bioactivities of the ethanolic extracts from Korean seaweeds were screened using *in vitro* assays, such as cholinesterase (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase) and lens aldose reductase inhibitory activities, and hepatoprotective effect on tacrine-induced hepatotoxicity in Hep G2 cells. Among them, *E. stolonifera* exhibited promising inhibitory properties against cholinesterase and lens aldose reductase, as well as potent hepatoprotective effect. Moreover, the organic solvent-soluble fractions, such as *n*-hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethylacetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and H₂O fractions derived from *E. stolonifera*, were evaluated via acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, and lens aldose reductase inhibitory activities and tacrine-induced hepatoprotective activity. Among the five fractions tested, the EtOAc soluble fraction had noticeable inhibitory activity towards acetylcholinesterase and lens aldose reductase, and potent hepatoprotective activity. Conversely, the *n*-hexane fraction had profound inhibitory activity against butyrylcholinesterase. Bioassay-guided isolation of the active *n*-hexane and EtOAc soluble fractions, obtained from the ethanolic extract of *E. stolonifera*, resulted in the isolation of twelve compounds (**1-12**). These compounds have been identified by direct comparisons of their spectral data with the reported ones: two sterols [fucosterol (**1**) and 24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol (**2**)] from the *n*-hexane fraction, and ten phlorotannins [phloroglucinol (**3**), dioxinodehydroeckol (**4**), eckol (**5**), phlorofucofuroeckol-A (**6**), dieckol (**7**), triphlorethol-B (**8**), 2-phloroeckol (**9**), 7-phloroeckol (**10**), diphlorethol (**11**), and fucofuroeckol-A (**12**)] from the EtOAc fraction. Among these compounds, compounds **8-11** were isolated from *E. stolonifera* for the first time and compound **12** was first isolated as free form from natural sources, although hepta-acetate of compound **12** has been previously isolated from *Eisenia arborea*. The molecular structure of these compounds was elucidated by 1D (¹H, ¹³C, DEPT) and 2D NMR (HMQC, HMBC) spectral data, and by comparison of their spectral data with those previously reported. The inhibitory activities of cholinesterase and lens aldose reductase of compounds **1-12**, and the protective effect on tacrine-induced hepatotoxicity were also evaluated. Of the isolated compounds, compounds **4-7**, **9**, and **10** exhibited potent acetylcholinesterase inhibitory activities, with IC₅₀ values of 42.66 ± 8.48, 20.56 ± 5.61,

4.89 ± 2.28, 17.11 ± 3.24, 38.13 ± 4.95, and 21.11 ± 4.16 µM, respectively. On the other hand, compound **2** showed marginal inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 389.10 ± 2.29 µM. Conversely, compounds **1**, **2**, **4**, and **6** exhibited moderate inhibitory activities against butyrylcholinesterase, with IC₅₀ values of 421.72 ± 1.43, 176.46 ± 2.51, 230.27 ± 3.52, and 136.71 ± 3.32 µM, respectively. However, compounds **3** and **8** showed no activity toward either acetylcholinesterase or butyrylcholinesterase. These results suggest that the degree of polymerization and closed-ring structure of phlorotannins may play key roles in the inhibitory potential of phlorotannins toward the cholinesterase (ChEs). The *E. stolonifera*-derived phlorotannins exhibited lens aldose reductase inhibitory activity with except of compounds **8**, **11**, and **12**. The IC₅₀ values of compounds **4** and **10** were 21.95 and 8.51 µM, respectively, the most active in the lens aldose reductase assay. The IC₅₀ values of compounds **5** and **7** followed, at 54.68 and 42.39 µM, respectively. Compound **6** exhibited marginal activity in the lens aldose reductase assay (IC₅₀ 125.45 µM). Among the isolated compounds, compounds **4** and **6** showed hepatoprotective activities with the EC₅₀ values of 62.0 and 79.2 µg/ml, respectively on tacrine-induced cytotoxicity in human liver-derived Hep G2 cells. The hepatoprotective activity of compound **4** is comparable with that (EC₅₀ = 50.0 µg/ml) of a positive control, silybin. However, compounds **3**, **5**, and **7** did not show any hepatoprotective activity.

Because phlorotannins isolated from *E. stolonifera* showed potent activities *in vitro* assays, further experiment *in vivo* was conducted to clarify the bioactivity of *E. stolonifera* and their phlorotannins using the hyperlipidemic rat models. The hypolipidemic effects of *E. stolonifera* and its major phlorotannin constituents were investigated using the hyperlipidemic rats induced by poloxamer 407 and hypercholesterolemic rats fed a high cholesterol diet. The hyperlipidemic rats induced by poloxamer 407, a hydrophilic non-toxic surface active agent, had remarkably high serum levels of triglyceride (TG), total and low density lipoprotein cholesterol (TC and LDL-C), and significantly increased atherogenic index (A.I.), while they were significantly decreased by the administration of ethanolic extract or phlorotannins rich EtOAc and *n*-BuOH fractions of *E. stolonifera*. In addition, high density lipoprotein cholesterol (HDL-

C) level in serum was reduced in poloxamer 407-induced hyperlipidemic control rats. However, the oral administration of the EtOAc and *n*-BuOH fractions significantly increased the HDL-C level. In particular, the EtOAc fraction showed more potent hypolipidemic effect than the *n*-BuOH fraction. The hypolipidemic effects of compounds **5** and **7**, the main compounds isolated from active EtOAc fraction, were also investigated using hyperlipidemic and hypercholesterolemic rat models. The elevated TC, TG and LDL-C levels, and A.I. values in poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats were significantly decreased after the oral administration of these compounds, while the level of HDL-C led to a significant increase. Moreover, the serum lipid levels, such as TC, TG and LDL-C, were elevated in high cholesterol diet fed rats, while lipid levels were significantly decreased in the rats administered by compound **7**. Furthermore, A.I. value was lowered by administration of compound **7**. However, compound **5** did not show any protective effect in hypercholesterolemic rats. In the present study, compound **7** exhibited stronger protective activities on hyperlipidemia than compound **5**, which was indicated that the degree of polymerization of phlorotannins seem to play key roles in the serum lipid level lowering potential.

The effect of *E. stolonifera* and *E. stolonifera*-derived phlorotannins on the ChEs, lens aldose reductase, hepatoprotective, and hypolipidemic activities were assayed with *in vitro* and *in vivo* assay in the present study to demonstrate for a potential utilization of functional food resource to treat or protect for Alzheimer's disease, diabetic complications, hepatotoxicity, and hyperlipidemia.

I. 서론

최근 국민소득의 향상과 더불어 식습관이 육류 중심으로 변화되면서 비만, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 심혈관 질환 등의 각종 질환의 증가와 노화 억제에 대한 관심이 증가하는 추세이다. 이러한 질병에 대응하고자 건강식과 자연식을 추구하는 웰빙식단이 인기를 누리게 되었고, 이와 더불어 해조류가 건강식품으로 그 가치를 재평가받고 있다. 해조류를 식용하는 풍습은 세계 여러 나라에서 흔히 볼 수 있으나, 많은 종류를 대량으로 상식하는 지역은 극동 및 동남아 지역과 오스트레일리아, 뉴질랜드 및 하와이제도와 같은 태평양 연안에 국한되고 있다 (이규태, 1994). 그 중 한국, 일본 및 중국 등지에서는 많은 해조류를 이용하므로 국가적으로 중요한 식품 재료이다. 그러나 해조류는 사람의 소화기에서 소화시킬 수 있는 효소가 존재하지 않기 때문에 영양적 가치는 크지는 않지만, 무기질, 비타민 및 미량의 원소의 공급원으로 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (유태중, 2000). 우리나라에서는 신석기 시대부터 오늘날까지 여러 가지의 수산물과 더불어 해조류를 이용하고 있다 (이규태, 1994). 해조류는 삼면이 바다인 우리나라에서는 아주 풍부한 자원으로서 오래 전부터 식품으로서 뿐만 아니라 전통 의약으로 습진 (eczema), 담석증 (gallactone), 구충제 (vermifuges), 만성 위염, 통풍, 암 그리고 신장 질환과 같은 광범위한 질병을 치료하는 목적으로 사용해왔다 (Chapman and Champman, 1980; Hoppe and Lerving, 1982; Srivastava and Kulshreshtha, 1989). 우리나라에서 서식하는 해조류는 63과 178속 414종이며, 식용을 포함해 실제로 이용되고 있는 것은 60 여종이라고 알려져 있다. 하지만 최근 우리나라에서 이용되는 해조류가 격감하여 식용 해조류도 30 여 종으로 급감하였는데, 그 중 김, 미역, 다시마, 파래, 툇, 모자반, 청각, 곰피, 우뭇가사리 등 몇 종이 현재 식용으로 이용되고 있다 (전남전략사업 기획단, 2004). 우리나라의 해조류 생산량은 기후, 해류 상황 및 소비량에 따라 해마다 그 변동폭이 크게 나타나는데, 평균적으로 연간 약 50

만 톤 규모로 생산되어 중국, 일본에 이어 세계 3위의 생산국이며, 2003년 기준으로 전체 수산물 생산량의 약 18.4% 수준으로서 어류 다음으로 큰 생산 비중을 차지하고 있어 결코 무시할 수 없는 수산자원의 하나로 인식되고 있다 (전남전략사업 기획단, 2004). 한국인의 해조류 소비량은 1995년 국민 1인당 11.6 kg이고 자급률이 134% 였던 것을 기점으로 매년 소비량이 줄어들어 2000년에는 5.0 kg (자급률 119%)에 머물렀다. 하지만 최근 전세계 해조류 생산량이 급격히 증가하고 있는데, 지난 1970년대 연평균 생산량이 180 만 톤이던 것이 2001년에는 800 만 톤이 생산되었다 (전남전략사업 기획단, 2004). 이는 해조류가 단순가공 형태를 벗어나 다양한 산업분야에서 이용되고 있음을 짐작할 수 있다. 최근에는 해조류로부터 기능성 소재를 분리하여 미용 및 의약품 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다. 1990년대 이후 일본과 우리나라를 중심으로 다양한 제품이 개발되고 있는데 식용제품의 경우, 가수분해물을 이용한 천연조미료, 해조면, 해조묵, 해조류 첨가 저열량 잼, 해조캔디, 해조올리고당, 해조호상 요구르트, 해조음료, 해조차, 해조쌀, 해조류 첨가 저열량 베이커리, 다양한 풍미의 조미김 등이 있으며, 해조류로부터 얻어지는 다양한 종류의 다당류를 이용한 기능성 식품은 일종의 민간약으로서 면역강화, 당뇨 치료물질로 이용되고 있어 건강보조식품 소재로서 고부가가치 창출과 소비확대를 위한 제품개발을 위한 연구가 계속되고 있다 (한복려, 1991; 이규태, 1994; 유태중, 2000; 전남전략사업 기획단, 2004).

Ecklonia 종의 대표적인 해조류인 곱피 (*Ecklonia stolonifera* OKAMURA)는 한국과 일본 등지에 분포하는 다년생 다시마과 (Laminariceae)에 속하는 갈조류로서 해안선을 따라서 2~10 m 수심에서 자라며, 다시마, 미역, 모자반, 톳 등과 함께 식용으로 이용하는 대표적인 해조류이다 (Hoppe and Lerving, 1982). 곱피는 항산화 활성 (Lee *et al.*, 1996a), 항돌연변이 활성 (Lee *et al.*, 1996b; Han *et al.*, 2000), 섭취저해효과 (Taniguichi *et al.*, 1991) 등의 생리활성이 알려져 있는데, 이와 같은 생리활성은 곱피로부터 얻어지는 2차 대사산물인 phlorotannin 성분

에 기인하는 것으로 알려져 있다. 곰피에서 알려진 2차 대사산물로는 phloroglucinol (Lee *et al.*, 1996a), eckol, dieckol (Kang *et al.*, 2004a) 등을 포함하는 phlorotannin류 화합물 (Taniguchi *et al.*, 1991), ecklonialactones (Kurata *et al.*, 1989; 1993) 그리고 vanadium bromoperoxidase (Hara and Sakurai, 1998)가 분리·동정되었다.

해조류에는 2차 대사산물로서 phenyl과 phenoxy기를 가지는 phloroglucinol을 기본단위로 하는 polyphenols인 phlorotannin 성분이 다량 함유되어 있다. Phlorotannin 화합물은 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol)을 기본구성 단위로 하는 phloroglucinol 중합체 형태의 페놀성 화합물로서 phloroglucinol unit의 결합 방법이나 하나 혹은 그 이상의 추가적인 phloroglucinol unit의 존재에 따라 종류가 달라지며, 해조류 중에 갈조류와 홍조류에 널리 분포한다 (Regan and Glombitza, 1986; Waterman and Mole, 1994; Arnold and Targett, 1998). 홍조류에 존재하는 phlorotannin 성분은 갈조류와 달리 Cl 혹은 Br과 같은 할로젠 원소가 결합된 형태로 존재한다 (Regan and Glombitza 1986; Zhao *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2000; Kurihara *et al.*, 1999a; 1999b; Wiemer *et al.*, 1991). 갈조류 (Phaeophyceae)의 경우 phlorotannin류 화합물은 건조 중량의 25%를 차지하며 (Targett *et al.*, 1992; Van *et al.*, 1999), 곰피와 감태가 속해있는 *Ecklonia* 종과 대황 등이 속해 있는 *Eisenia* 종에 풍부한 이들 성분은 세포벽을 구성하는 중요한 성분이다 (Regan and Jamieson, 1982; Waterman and Mole, 1994; Arnold and Targett, 1998). 이들 성분은 polyketide pathway라고 불리는 acetate-malonate pathway를 통해서 생성되며, 이들 성분이 들어있는 소낭 즉, physodes (phenolic containing vesicles)는 자외선 과다한 조사에 대해 식물을 보호하는 역할을 한다. Phlorotannin 성분은 초식동물에 대한 화학적 방어를 하고, 방오물질로 작용하여 생태학적으로 중요한 역할을 한다 (Waterman and Mole, 1994; Steinberg, 1988; Targett and Arnold, 1998; Arnold and Targett, 2000; Pavia and Toth, 2000a; Seiburth and Conover, 1965; Wikstrom and Pavia, 2004).

Phlorotannin의 함량은 해조류가 서식하는 바다의 염분, 영양소, 빛의 이용가

능성, 자외선 조사량 등의 환경적 요인에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Yates and Peckol, 1993; Peckol *et al.*, 1996; Pavia *et al.*, 1997; Pavia and Toth, 2000b; Honkanen *et al.*, 2002; Swanson and Druehl, 2002).

Phlorotannin은 phloroglucinol unit 결합방법에 따라 크게 4가지로 분류할 수 있다.

첫번째, phloroglucinol unit 간에 ether 결합을 하는 경우이며, 대표적으로 fuhlols과 phloroethols이 있다. 여러 종류의 fuhalols, phloroethols와 hydroxyphlorethols은 갈조류인 *Carpophyllum* 종 (*C. masculocarpum*, *C. angustifolium*) [Glombitza and Li, 1991; Glombitza and Schmidt, 1999; Li and Glombitza, 1991]과 *Sargassum* 종 (*S. spinuligerum*, *S. muticum*) [Keusgen and Glombitza, 1995; Glombitza and Keusgen, 1995; Glombitza *et al.*, 1978a]에서 뿐만 아니라 *Halidrys siliquosa* (Glombitza and Sattler, 1973)와 *Laminaria ochroleuca* (Glombitza *et al.*, 1976)에서 분리되었다.

두번째, phloroglucinol unit 간에 phenyl 결합에 의해 형성된 화합물로서 fucols이 있으며, 이들 화합물은 *Himantalia elongate* (Glombitza *et al.*, 1977), *Plenrophyucus gardneri* (Glombitza and Knoss, 1992), *Analipus japonicus*, *Fucus vesiculosus* (Glombitza and Zieprath, 1989; Glombitza *et al.*, 1975) 등의 해조류로부터 분리되었다.

세번째, phloroglucinol unit의 ether와 phenyl 결합이 혼합된 형태로서 fucophlorethols이 있으며, *Fucus vesiculosus*, *Cystoseira baccata*, *Analipus japonicus* (Glombitza and Zieprath, 1989; Glombitza *et al.*, 1975; 1978c), *Laminaria ochroleuca* (Glombitza *et al.*, 1978b), *Cystoseira granulate* (Glombitza *et al.*, 1985) 등에서 분리되었다.

네번째, phloroglucinol unit가 dibenzo-[1,4] dioxin 결합에 의해 형성된 것으로 eckol과 carmalol이 대표적인 화합물이다. 이들 화합물은 *Eisenia bicyclis* (Okada *et al.*, 2004), *Eisenia arborea* (Glombitza and Gerstberger, 1985), *Carpophyllum masculocarpum* (Li and Glombitza, 1991), *Ecklonia kurome* (Fukuyama *et al.*, 1989),

Ecklonia stolonifera (Kang *et al.*, 2003a; 2004a) 등에서 분리되었다.

이들 phlorotannin 화합물의 알려진 생리활성으로는 항산화 활성 (Lee *et al.*, 1996b; Kang *et al.*, 2004a; 2005a; 2005b; 2007; Nakamura *et al.*, 1996), 항돌연변이 활성 (Lee *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 2000), 섭식저해효과 (Taniguchi *et al.*, 1991), tyrosinase 억제활성 (Kang *et al.*, 2004b), 항피부노화 활성 (Kim *et al.*, 2006a; Joe *et al.*, 2006; Bu *et al.*, 2006), antiplasmin 효과 (Fukuyama *et al.*, 1989), 항바이러스 활성 (Ahn *et al.*, 2004a; 2004b; 2006), 심혈관 보호 효과 (Kang *et al.*, 2003b), glycosidase 억제활성 (Shibata *et al.*, 2002a), 기억개선 효과 (Myoung *et al.*, 2005), hyaluronidase 억제활성 (Shibata *et al.*, 2002b; Bu *et al.*, 2006) 그리고 항알레르기 활성 (Sugiura *et al.*, 2006) 등이 연구되었으나, phlorotannin 성분의 cholinesterase 억제활성, lens aldose reductase 억제활성, tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 간보호 활성 그리고 고지혈증 흰쥐 모델에서의 저지혈증 효과에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

***in vitro*에서 cholinesterase 억제활성**

우리 사회의 고령화가 급속히 진행됨에 따라 알츠하이머병의 발생률과 유병률이 크게 증가하고 있다. 노인성 치매로 알려진 알츠하이머병은 노인성 치매 원인의 50~60%를 차지할 정도로 가장 흔한 질환이며, 대표적인 퇴행성 뇌질환으로 점진적인 기억, 사고 및 행동장애를 나타낸다 (Alzheimer, 1907). 1907년에 Alois Alzheimer가 처음 보고한 이후로 많은 연구가 이루어져 현재 새로운 분자생물학적, 유전학적 사실이 밝혀지면서 알츠하이머병의 병태생리 및 발병 기전에 대해 밝혀지고 있다. 알츠하이머병에 대한 알려진 병인으로는 amyloid β peptide (A β)의 생성 및 침전, 신경섬유의 엉킴 (neurofibrillary tangles, NFT) 그리고 cholinesterase에 의한 콜린성 신경세포의 감소 등에 의한 뇌의 구조적 변화 등이 있다 (Coyle *et al.*, 1983). 알츠하이머병의 발병 원인 중 하나인 acetylcholinesterase는 알츠하이머병 초기에 신경 전달 물질인 acetylcholine을

choline과 acetate로 분해시켜 콜린성 뉴런을 소실시키고, 콜린성 신경전달을 감소시켜 알츠하이머병을 유발한다 (Fig. 1) [Greig *et al.*, 2001]. Acetylcholinesterase와 함께 알츠하이머병의 원인으로 알려진 butyrylcholinesterase는 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, 노인성 치매 환자의 뇌에서 다량으로 발견되며, 치매를 유발하는 신경성 plaque를 형성하는데 작용하고, 알츠하이머병의 후기에 acetylcholine의 분해를 담당하여 치매의 환자의 행동심리에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Yu *et al.*, 1999). 그러므로, 알츠하이머병 치료에서 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase를 균형적으로 억제하는 것은 더 큰 치료 효과를 나타낼 수 있다고 알려져 있다 (Yu *et al.*, 1999).

알츠하이머병의 치료제로 많은 약물이 개발되고 있으나 현재까지 효과가 탁월한 원인적 치료 약물은 아직 없는 실정이다. 다만 알츠하이머병의 주요 증상인 대뇌 기저부 (basal forebrain)의 콜린성 신경의 손상에 의해 기인된 것이라는 가설에 바탕을 둔 인지기능의 장애에 대해 acetylcholinesterase를 억제하여 신경연접부 (synaptic cleft)에서 acetylcholine의 양을 증가시키는 약제들 즉, acetylcholinesterase 억제제가 가장 좋은 효과를 나타내고 있으며, 이들 cholinesterase 억제제가 미국 FDA에서 승인을 받고 임상에서 널리 사용되고 있다 (National Institute of Clinical Excellence, 2001; Lee, 2006). Acetylcholinesterase 억제제는 알츠하이머병의 초기 및 중기 환자의 25~40% 범위에서 인지기능의 호전을 보였으나, 고도의 치매의 경우 그 효과는 현저하게 감소되는 것으로 알려져 있다 (National Institute of Clinical Excellence, 2001; Qizibash *et al.*, 2002). 현재까지 미국 FDA로부터 승인된 cholinesterase 억제제로는 tacrine (Cognex), donepezil (Aricept), rivastigmine (Exelon), galantamine (Reminyl) 등이 있다. 이들 약제는 이론적으로 작용기전이 조금씩 다르나 이러한 차이가 실제 임상에서 치료의 적응증이나 효과의 차이를 가져오는지는 분명치 않다. 또한 약제들간의 비교연구가 거의 없어 효과에 대한 상대적인 우월성을 나타내기는 힘들지만 비슷한 수준이라고 보고되고 있다 (National Institute of Clinical Excellence, 2001).

최근 연구에 의하면 cholinesterase 억제제를 장기간 사용할 경우 인지능력이나 행동 증상을 완화시킬 뿐만 아니라 뇌신경세포 보호작용을 할 가능성이 제기되고 있다 (Hashimoto *et al.*, 2005; Krishnan, 2003). 하지만, 이들 약물을 복용했을 때, 공통적인 부작용으로 acetylcholine의 증가로 인한 오심, 설사, 식욕감퇴, 근육경련 및 수면장애 등이 나타날 수 있으며, 간독성 및 위장관 질환을 유발하거나 음식물 혹은 약물의 생화학적 이용에 장애를 일으키기 때문에 이들 약물의 사용이 제한되고 있다 (Schulz, 2003; Small *et al.*, 1997; Melzer, 1998).

그러므로, 천연물로부터 부작용이 없고 보다 안전한 cholinesterase 억제제에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며, 이전 연구에서 육상식물로부터 분리된 cholinesterase 억제 성분으로는 alkaloids (Bruehlmann *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2001; 2002; 2004; Cláudia *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2003; 2006; Kim *et al.*, 2004; Decker *et al.*, 2004), farnesylacetone derivatives (Ryu *et al.*, 2003), pyrazoline derivatives (Ucar *et al.*, 2005), withanolides (Chounhary *et al.*, 2004), terpenoids (Perry *et al.*, 2000; Savelev *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2005), shikimate derivatives (Lee *et al.*, 2004a), flavonoids (Orhan *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2001; Urbain *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2003; Bruehlmann *et al.*, 2004), sterols (Ahmed *et al.*, 2006) 등이 알려져 있으나, 해조류에서 분리된 phlorotannin 성분에 대한 cholinesterase의 억제효과에 대해서는 아직 보고되지 않았다.

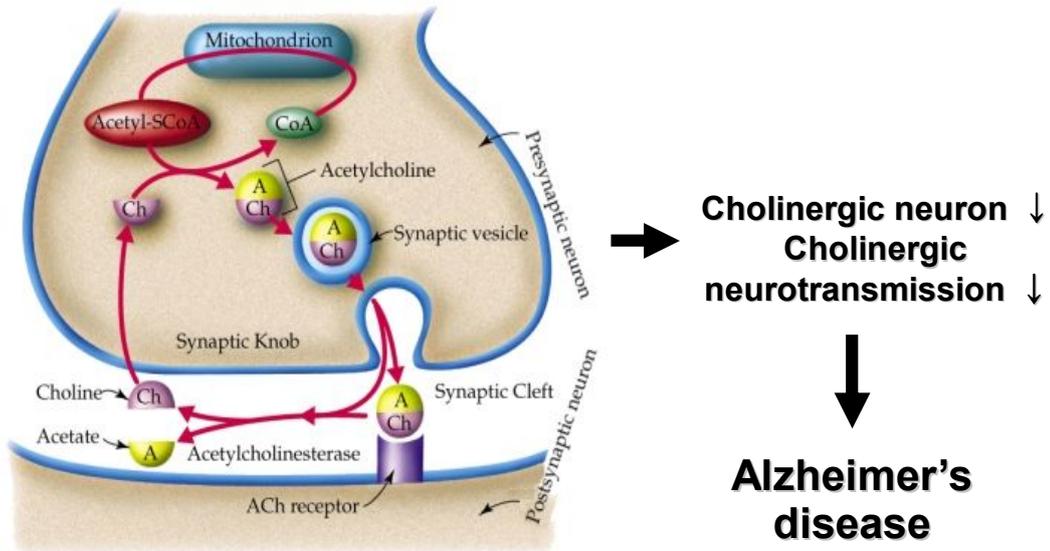


Fig. 1. Mechanism of acetylcholinesterase (Greig *et al.*, 2001).



*in vitro*에서 lens aldose reductase 억제활성

당뇨병은 대표적인 성인병의 하나로, 생활수준의 향상과 더불어 생활양식이 서구화되면서 점차로 환자 수가 증가하고 있다 (김응진 등, 1998). 당뇨병은 체내 세포에서 포도당을 사용할 수 있는 능력에 장애가 생겨 혈당치가 증가하면서, 과량의 당이 소변으로 배설되는 대사성 질환으로 (Abuja and Albertini, 2001), 당뇨병 그 자체보다 합병증에 대한 위험성이 크기 때문에, 오늘날 당뇨병 치료에서 가장 큰 목표는 당뇨병 합병증의 유발 혹은 진행을 억제하는 것이다. 대표적인 합병증으로는 당뇨병 망막증, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증이 있으며, 특히, 당뇨병 망막증은 미세혈관의 합병증으로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다 (Seaquist *et al.*, 1989).

당뇨병에서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 고혈당에 의한 polyol pathway의 이상 (Sato and Rifkin, 1989), 산화적 스트레스 (Williamson *et al.*, 1993), myoinositol의 감소와 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성 감소 (Greene *et al.*, 1987) 등이 보고되었다. 정상상태에서는 glucose는 생명을 유지하기 위한 중요한 에너지원으로 췌장 β 세포에서 분비되는 insulin에 의해 세포로 유입된 후, 대부분이 해당계에서 대사되고, polyol pathway (Fig. 2)를 통하여 대사되는 양은 3%에 불과하다 (Greene *et al.*, 1987). 그러나 당뇨병에 의해 고혈당이 지속되면 신장세포, 신경세포, 수정체, 망막세포와 적혈구 등은 glucose 유입이 insulin에 의존하지 않고 확산에 의해 유입되어 이들 세포내의 glucose 농도는 자동적으로 상승하게 된다 (Travis *et al.*, 1974). 세포내에 유입된 고농도의 glucose에 의해 aldose reductase가 활성화되어 정상 상태의 약 2~4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다 (Malone *et al.*, 1980). 생성된 sorbitol은 축적되는 부위에 따라 발병증상이 나타나는데, 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증, 당뇨병 신증과 같은 당뇨 합병증을 일으킨다 (Heath and Hamlett, 1976).

당 알코올인 sorbitol은 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에

sorbitol이 세포내에 축적되고, 축적된 sorbitol에 의해 세포내 삼투압을 증가시켜, 수정체내로 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으키며, 이 팽화는 수정체 섬유세포의 투과성을 향진하고, Na⁺의 유입과 K⁺, 아미노산, 펩타이드, ATP, myo-inositol 등을 유출시킨다 (Gabbay and O'Sullivan, 1968). 이와 동시에 세포내 단백질 변성이 진행되어 수정체가 혼탁하게 되는데, 이와 같은 수정체의 혼탁으로 나타나는 백내장 증상을 당뇨병 진행과정의 한 지표로 사용한다 (Dvornik *et al.*, 1973).

이론적으로 sorbitol을 생성하는 효소인 aldose reductase를 억제하는 것은 sorbitol의 생성을 억제할 수 있다고 생각해왔으며, 실제로 많은 연구 보고에 의하면, *in vitro* 실험에 있어서 aldose reductase를 억제하는 물질이 실험적 당뇨병 백내장의 실험모델인 galactosemic rats에서 백내장의 형성이 억제될 수 있음이 밝혀졌다 (Verma and Kinoshit, 1976; Parmar and Ghosh, 1979).

현재 천연물로부터 aldose reductase 억제제에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 대표적인 성분으로는 육상식물로부터 분리된 flavonoids, phenol성 화합물, terpenes 등이 알려져 있다 (Verma and Kinoshita, 1976; Kawanishi *et al.*, 2003).

비록, aldose reductase 억제제에 대한 많은 연구가 이루어지고 있지만, 해조류와 해조류에서 분리된 phlorotannin 성분에 대한 aldose reductase 억제활성 대한 연구는 아직 수행되지 않았다.

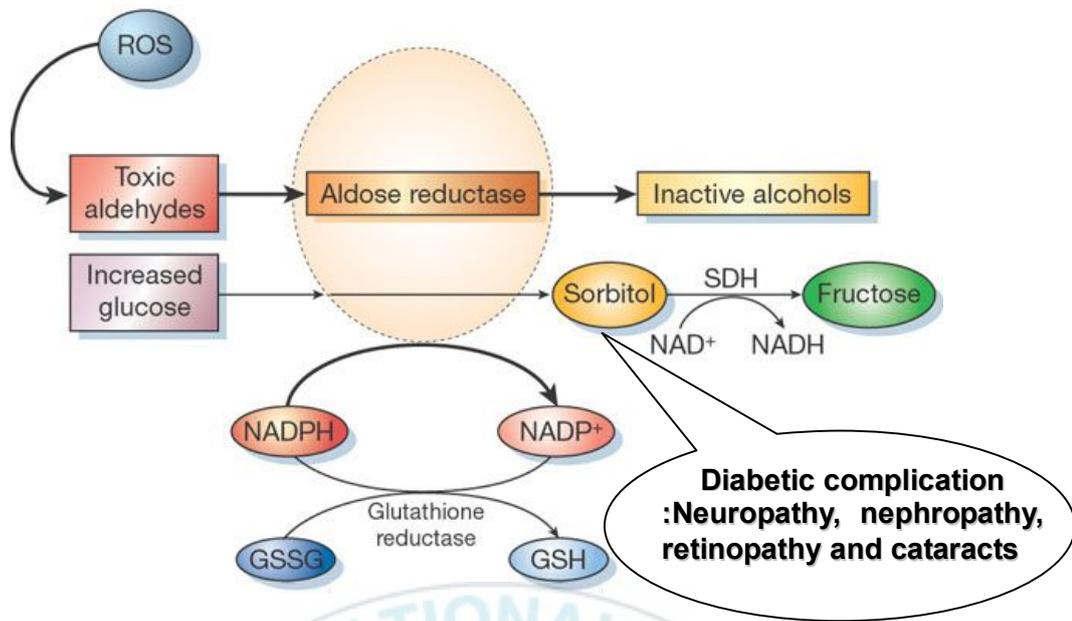
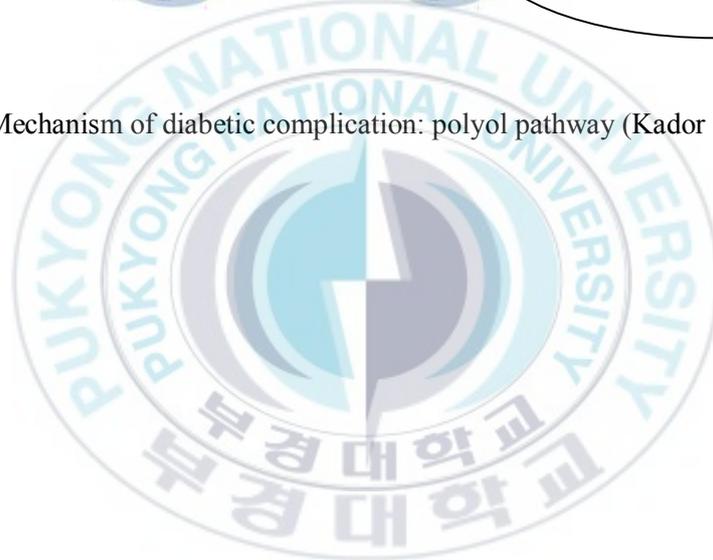


Fig. 2. Mechanism of diabetic complication: polyol pathway (Kador *et al.*, 1985).



*in vitro*에서 tacrine으로 유도된 간세포 독성으로부터 간보호 효과

간은 소장관으로부터 흡수되는 유해한 물질 (endotoxins) 뿐만 아니라 대사 생성물에 의한 독성으로 생체를 보호하는 기관으로서 간질환은 심각한 건강문제로 인식되고 있다.

신경전달물질인 acetylcholine을 분해하는 acetylcholinesterase의 억제제로서 사용되는 tacrine (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 노인성 치매의 대표적인 질환인 알츠하이머병의 치료를 위해 미국 FDA에서 처음으로 승인된 약물이지만, 장기간 약물을 복용하면 복용환자의 30~50%가 변형된 혈청 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 활성과 함께 가역적인 간독성을 나타내어 치료용으로 사용하는 것이 제한되었다 (Watkins *et al.*, 1994). Tacrine에 의해 유발되는 간독성의 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, Hep G2 cell이나 인간 간세포에서 ROS의 생성을 촉진시켜 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 3) [Osseni *et al.*, 1999]. 간독성 유발 기전에 대한 많은 연구가 수행되고 있지만, 항산화력과 간보호 활성간의 상관관계는 아직 정확하게 밝혀지지 않았으며, 많은 연구에 의해 이들의 기전과 이들 두 활성간의 상관관계를 밝혀내기 위해 노력하고 있다.

본 연구에서는 인간 간암 세포종인 Hep G2 cell을 tacrine으로 유발된 간세포 독성에 대한 간보호 효과를 검색하는데 사용하였다. Hep G2 cell은 실제적으로 쥐의 primary hepatocyte에서 잃기 쉬운 간세포의 특이적 세포 표면의 receptor와 plasma 단백질의 합성과 분비기능을 보존하고 있으며, 쥐의 primary hepatocyte와 같은 기능을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 간독성 실험에 많이 사용되고 있다 (Grant *et al.*, 1988; Viau *et al.*, 1993).

간독성 유발 여부를 측정하기 위해 사용되는 방법으로 *in vitro*에서 Hep G2 cell과 primary hepatocyte를 이용하고 tacrine 이외에 요로감염증의 예방과 치료에 사용하는 nitrofurantoin {1-(5-nitro-2-furfurylideneamino)-hydantoin} [An *et al.*, 2005]과 palmitate (a long chain saturated fatty acid) [Song *et al.*, 2007], D-

galactosamine (D-GalN) [Ninomiya *et al.*, 2007] 등을 이용하며, *in vivo*에서는 carbon tetrachloride (CCl₄) [Chen *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2000; Bodakhe and Ram, 2007], 해열 진통제인 paracetamol과 acetaminophen (Uskokovic-Markovic *et al.*, 2007; Yapar *et al.*, 2007), 결핵 치료제로 사용되는 isoniazid와 rifampicin (Adhvaryu *et al.*, 2007; Santhosh *et al.*, 2007), 담배연기에 함유되어 있는 성분 중 하나인 dimethylnitrosamine (DMN) [Kim *et al.*, 2007], 간독성 유발물질로 알려진 thioacetamide (TAA) [Sehrawat *et al.*, 2006], *Aspergillus* 종의 독소인 aflatoxin-B₁ (Naaz *et al.*, 2007), 알코올의 주성분인 ethanol과 비소 (arsenic) [Donohue *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2007] 등을 이용하여 실험동물에게 간독성을 유발하여 천연물로부터 분리된 화합물을 투여하여 그 효과를 확인하고 있다.

이들의 약물에 의해 유발되는 간독성의 기전은 아직 정확하게 밝혀지지지는 않았지만, 최근 연구에 의하면 이들 약물이 체내에 들어오면 간에 존재하는 약물대사 반응 촉진제인 cytochrome P-450이 반응하여 친전자성 대사산물을 생성하고, 그것은 glutathione과 결합하여 불활성화 된다 (Oreinius and Moldeus, 1984; Dahlin *et al.*, 1984). 이 반응에서 생성되는 많은 대사산물은 세포내에서 superoxide anion과 다른 free radical을 생성하게 되고 (Vries, 1984), 이때 중간대사산물이 축적된다. 생성된 free radical을 소거하기 위해서 glutathione은 소모되며, glutathione의 부족에 의해 소거되지 않거나 새로 생성된 radical은 DNA, 단백질, 지질과 결합하여 지질 과산화를 유발하고, 간세포를 괴사시켜 급성 간손상을 유발한다고 알려져 있다 (Mitchell *et al.*, 1973; Recknagel *et al.*, 1989; Janakat and Al-Merie, 2002; Weber *et al.*, 2003).

간보호 활성에 대한 많은 연구에서 천연물로부터 sesquiterpenes계 (Oh *et al.*, 2002a), coumarins계 (Oh *et al.*, 2002b), diarylheptanoids계 (Cho *et al.*, 2001), phenol성 화합물 (An *et al.*, 2005; 2006; Oh *et al.*, 2004) 그리고 polysaccharides (Chen *et al.*, 2006) 등이 tacrine으로 유발된 간세포 독성에 대하여 간보호 효

과를 나타낸다고 알려져 있지만, 해조류에서 분리된 phlorotannin류 화합물의 간독성에 대한 간보호 효과에 대해서는 아직까지 보고된 바는 없다.



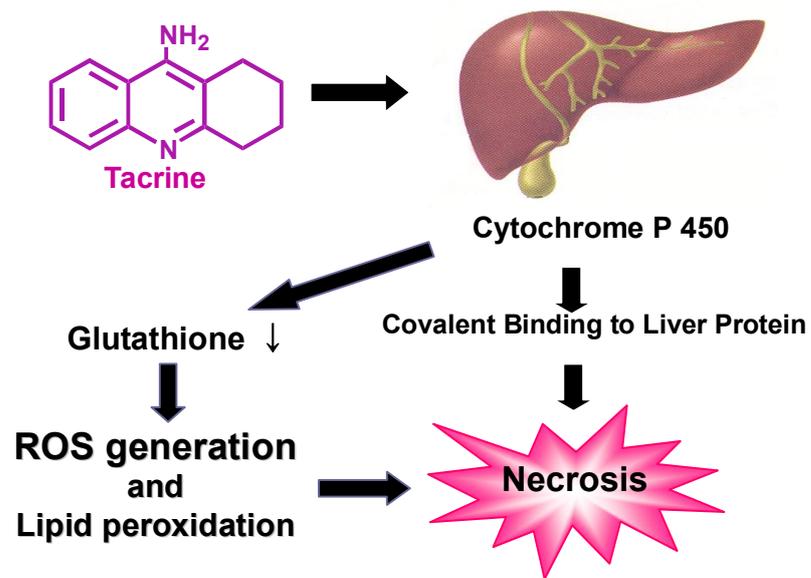
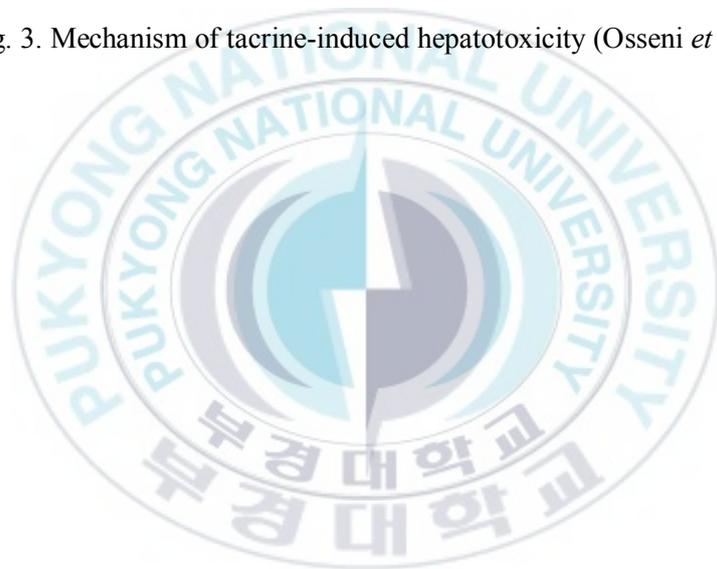


Fig. 3. Mechanism of tacrine-induced hepatotoxicity (Osseni *et al.*, 1999).



***in vivo* 실험에서 고지혈증 모델 흰쥐에 대한 보호효과**

선행연구에 따르면 phlorotannin 성분은 심혈관계 질환과 관련이 있는 ONOO⁻ 소거활성과 angiotensin-converting enzyme 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Jung *et al.*, 2006). 이러한 결과를 바탕으로 대표적인 심혈관 질환인 아테롬성동맥경화증과 아주 밀접한 관련이 있는 고지혈증에서의 phlorotannin 성분의 고지혈증 억제효과를 고지혈증 동물모델을 이용한 *in vivo* 에서 연구하고자 하였다.

고지혈증은 총 콜레스테롤, low density lipoprotein (LDL) 콜레스테롤, 중성지질, 인지질, 유리지방산과 같은 혈청 지질에서 하나 혹은 그 이상이 비정상적으로 상승하는 것으로, 아테롬성동맥경화증, 심근경색, 심장발작과 같은 심혈관 질환 발병에 주요 위험 인자로 알려져 있다 (Talbert, 1997; Wald and Law, 1995). 이것은 과도한 양의 지방섭취와 부적절한 형태의 지질 섭취에 의한 것으로 체내에 과다한 지방의 축적으로 인해 고지혈증이 유발된다 (Oliveros *et al.*, 2003).

콜레스테롤은 인체의 기능을 정상적으로 유지시키는데 필수적인 구성성분으로 세포의 생성과 부신피질 호르몬 등과 같은 호르몬 합성의 원료가 되며, 담즙을 만드는데 이용되므로 인체에는 반드시 필요한 영양소이다 (Libby *et al.*, 2000; Berliner and Heinecks, 1996). 그러나, 콜레스테롤의 과도한 섭취는 콜레스테롤을 혈관내에 축적시키고, 혈중 고콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스가 촉진되는데, 이 때 항산화 효소의 양과 활성은 충분하지 않기 때문에 생체내 free radicals을 제거하는 항산화 방어계 (antioxidative defense system)에 불균형을 가져오게 되어, 심혈관계 질환을 유발하는데 중요한 병인으로 작용한다고 보고되고 있다 (Levy, 1981; Lee *et al.*, 2003; Yokozawa *et al.*, 2006).

고지혈증의 병태모델은 크게 내인성 모델과 외인성 모델로 나누어진다. 내인성 고지혈증 병태모델은 fructose 투여 및 Triton WR-1339와 poloxamer 407 투여에 의한 동물모델이 있으며, 외인성 병태모델은 고콜레스테롤 식이에 의해 유발되는 고콜레스테롤혈증 모델이 있다 (Ham *et al.*, 2005). 내인성 고지혈증

모델에서 사용되는 poloxamer 407은 친수성의 무독성 계면활성제로 세포막 투과성, 혈관 폐색, 약물 전달계의 작용과 같은 특이적인 기전을 가진 것으로 알려져 있다 (Schmolka, 1991; Johnston and Palmer, 1997; Cogger *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2005; Raymond *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2005; Sanna *et al.*, 2004). 이 약물을 실험 동물에게 복강투여하면 24시간 내에 지방조직에서 유리 지방산이 생성되며 (Nash *et al.*, 1996), lipoprotein lipase의 작용을 방해하는 중성지질의 분해속도를 감소시키고 (Johnson and Palmer, 1993; Wout *et al.*, 1992), 혈액내의 총 콜레스테롤과 중성지질이 증가되는데 이는 간에서의 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase의 활성을 자극시켜 고지혈증을 유발하게 된다 [Wout *et al.*, 1992]. 외인성 고지혈증의 병태모델은 흰쥐에게 콜레스테롤 식이를 먹이면 소장에서 소화·흡수된 chylomicron (중성지질 90%)이 증가하게 되고, 증가된 chylomicron은 lipoprotein lipase의 작용에 의해 가수분해가 일어나 70~90%의 중성지방이 제거되면 잔여 지단백의 형태로 간으로 순환하게 된다. 이때 지속적인 고콜레스테롤 식이 섭취에 의해 잔여 지단백이 증가하면 간에서 very low density lipoprotein (VLDL)의 방출량이 증가하게 된다. 이 과정에서 lipoprotein lipase가 감소하여 중성지질이 증가하게 되고, LDL 콜레스테롤 수용체가 감소하여 LDL 콜레스테롤이 증가하게 된다. 이러한 지질성분이 증가하게 되면 이들을 운반하는 high density lipoprotein (HDL) 콜레스테롤이 소모되어 그 양이 감소하게 되면서 고지혈증이 유발된다 [Jain *et al.*, 2007].

고지혈증으로 증가된 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 방법으로는 저 콜레스테롤 식이 외에 콜레스테롤 저하 약물을 복용하는 방법이 있다고 알려져 있다. 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키는 약물로는 lovastatin, simvastatin, pravastatin-Na 그리고 atorvastatin과 같은 statin계 화합물이 있으며, 이들 화합물은 간에서 콜레스테롤과 중성지질을 생합성하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase (HMG-CoA reductase) 작용을 억제하여, 상승된 콜레스테롤과 중성지질을 저하시켜 고지혈증 치료제로 이용되고 있다 (Pazzucconi *et al.*, 1995). 그러나

합성 HMG-CoA reductase 억제제는 혼합형 고지혈증에서 혈중 중성지질을 저하시키는 효과가 둔화되고, 두통, 설사, 복통, 경련과 같은 부작용을 유발하는 것으로 알려졌다 (McKenney, 2001; Erkelens *et al.*, 1988). 이러한 합성제제의 부작용 때문에 최근에 혈청지질의 농도를 낮추기 위하여 천연물을 이용한 식이요법이나 한방, 민간요법을 이용하여 혈중 LDL 콜레스테롤 함량을 낮춤으로써 심혈관계 질환으로 이환될 위험을 저하시킬 뿐만 아니라 동맥경화증의 예방이나 치료를 가능하게 할 수 있는 많은 연구가 진행되고 있으며, 대표적으로 식이 섬유 (Yamada *et al.*, 2003), 식물성 sterols (Nigon *et al.*, 2001), 약초 추출물 (Oh *et al.*, 2002c; Megalli *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 1994) 그리고 효모 (Elwood *et al.*, 1982) 등이 알려져 있다. 이 외에 해조류에 대한 항고지혈증 활성이 알려져 있지만, 단지 *Caulerpa racemosa*, *Colpomenia sinuosa*, *Iyengarisa stellata*, *Solieria robusta*, *Spatoglossum asperum* (Ara *et al.*, 2002), 톳 (*Hisikia fusiforme*) [Amano *et al.*, 2005], 파래 (*Enteromorpha linza*), 홀파래 (*Monostroma nitidum*) [Ren *et al.*, 1994]와 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*) [Lee *et al.*, 2006]의 추출물과 carrageenan, agar, laminarian (Kim *et al.*, 2006b), alginate (Kimura *et al.*, 1996), fucoidan, glucuronoxylorhamnan (Wang and Yang, 1997) 등과 같은 polysaccharides와 fiber 성분에 그치고 있다. 그러나, 곰피와 곰피의 생리활성 성분인 phlorotannin의 고지혈증 억제효과에 대해서는 아직 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 곰피와 곰피의 생리활성 성분인 phlorotannin에 대한 알츠하이머병, 당뇨병 합병증, tacrine으로 유도된 간세포 독성 그리고 고지혈증에 대한 억제효과를 cholinesterase 억제활성법, lens aldose reductase 억제활성법, 간보호 활성법 그리고 고지혈증 억제활성법을 *in vitro*와 *in vivo*에서 수행하여 곰피와 곰피에서 분리된 phlorotannin 성분이 알츠하이머병, 당뇨병 합병증, 간보호 뿐만 아니라 고지혈증을 치료하고 예방할 수 있는 기능성 식품 소재로서 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 곰피는 2000년 2월에 부산 기장군 대변항에서 채집하여 강릉대학교 김형근 교수의 감정을 받았으며, 그 표본은 본 연구실에 보관하고 있다. (No.20000228). 생리활성 검색에 사용된 구멍갈파래, 톳, 다시마, 참모자반, 지충이, 팽생이모자반, 뜸부기, 미역, 모자반 중, 돌가사리, 부채살, 진두발, 개도박, 서실, 김, 감태, 우뚝가사리, 매생이, 잎파래, 파래, 청각, 벚붉은잎, 패, 갈래곰보, 불등가사리, 꼬시래기, 산호말, 보라우무 등은 2004년 1월에 부산 청사포에서 채집하여 부경대학교 손철현 교수의 감정을 받았으며, 그 표본은 본 연구실에 보관하고 있다 (No. 20040130-1~29).

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing materials은 Kieselgel 60 (Si gel, 70-230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734), Sephadex LH-20 (bead side 25–100 μm , Sigma), RP-18 (LiChroprep[®] RP-18, 40–63 μm , Merck)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)과 RP 18 F_{254s} (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, spray reagent는 50% H₂SO₄를 사용하였다. 그리고 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정에 사용한 용매는 DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories, deuterium degree 99.9%)이다. RPMI 1640 medium, trypsin-ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), antibiotics는 Gibco Laboratories (Grand Island, NY), fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone Laboratories (Logan, UT), 96 well과 조직 배양 용 dish는 Nunc, Inc. (North Aurora, IL)에서 구입하였으며, tacrine, silybin, 3'-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), electric-eel acetylcholinesterase (EC 3. 1. 1. 7), horse-serum butyrylcholinesterase (EC 3. 1. 1. 8),

acetylthiocholine iodide, butyrylthiocholine chloride, 5, 5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid] (DTNB), eserine, berberine, poloxamer 407, DL-glyceraldehyde, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), quercetin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaOH은 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan), Na_2HPO_4 는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan) 에서 구입하였다. Lovastatin은 유한양행으로부터 제공받았으며, 중성지질, 총 콜레스테롤, LDL과 HDL 콜레스테롤 측정용 kit 시약은 Shinyang Chemical Co. Ltd. (Korea)에서 구입하였다.

2-2. 실험 동물

4 주령의 120 g의 수컷 Sprague-Dawley (SD)계 쥐는 Samtaco Bio Korea Ltd. (Korea)에서 구입하였다.

2-3. 기기

^1H -와 ^{13}C -NMR은 JEOL JNM-ECP 400 spectrometer (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 100 MHz, JEOL, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 2D-NMR인 HMQC, HMBC는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다. TLC상의 화합물 검색을 위해 장파장 (365 nm)과 단파장 (245 nm) 겸용 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, USA)를 사용하였다.

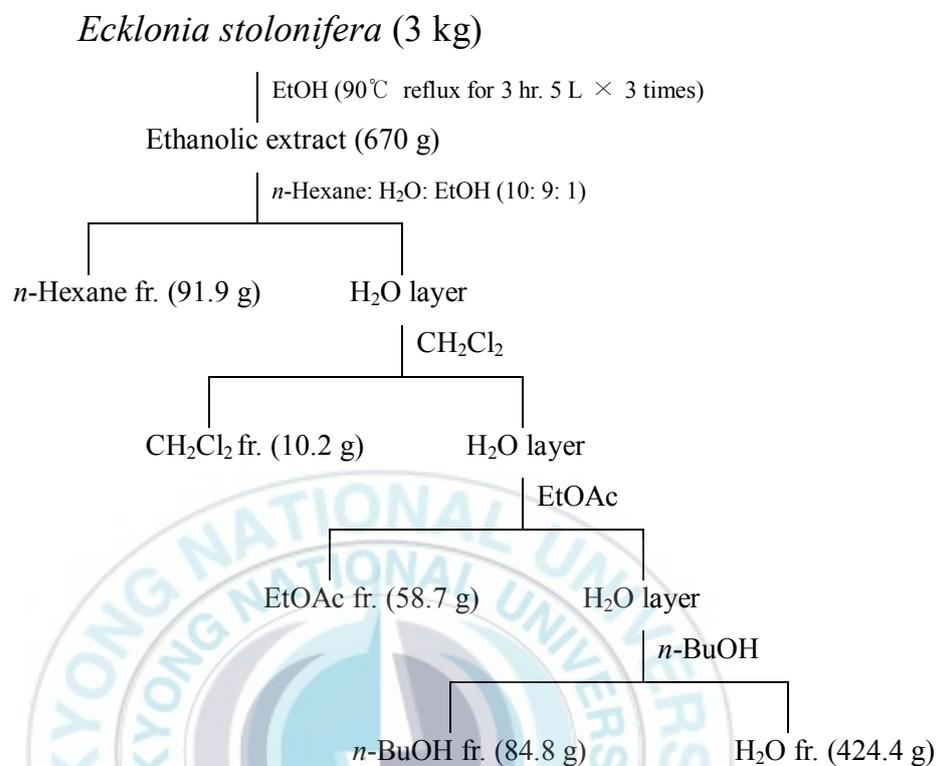
간보호 효과에서 간세포 생존률과 cholinesterase 억제 활성에서의 흡광도 측정은 microplate reader spectrophotometer VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였고, 고지혈증 억제활성에서 중성지질, 총 콜레스테롤, LDL과 HDL 콜레스테롤 측정에서의 흡광도와 lens aldose reductase 억제활성에서의 흡광도는 UV spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 *pro*, Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다.

3. 실험방법

3-1. 추출 및 분획

생리활성 검색에 사용한 해조류는 건조중량 100 g을 분쇄한 후, 1 L의 ethanol 을 넣고 수욕상에서 3 시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다 (40℃). 위와 같은 방법으로 다시 2 회 더 반복하여 각각의 해조류 ethanol 추출물을 얻었다. 각각의 ethanol 추출 물은 cholinesterase 억제활성법, lens aldose reductase 억제활성법 그리고 간보호 활성법을 이용하여 그 효과를 측정하였다. 검색한 해조류 중 가장 큰 효과를 나타낸 곰피를 이용하여 이들 생리활성에서 효능을 나타내는 활성성분을 분리 하고자 하였다.

곰피 (*Ecklonia stolonifera*)의 ethanol 추출 및 각 용매별 분획과정은 Scheme 1 에 나타났다. 곰피엽상체를 동결건조 후 분말로 만든 시료 3 kg을 환류 냉각 기를 부착한 집기병에 담은 후 5 L의 ethanol을 넣고, 수욕상에서 3 시간 추출 하였다. 그리고 추출액은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하 였다 (40℃). 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 670 g의 ethanol 추 출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:ethanol (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔 대기에 부어, 동량의 *n*-hexane을 넣어 분액 깔대기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 *n*-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 *n*-hexane 분획물 91.9 g을 얻었다. 동일한 방법으로 CH₂Cl₂를 H₂O층 에 가하여 하층의 CH₂Cl₂ 가용부를 모아 CH₂Cl₂ 획분 10.2 g을 얻었다. H₂O층 에 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 58.7 g을 얻었 다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 84.8 g과 하층의 H₂O 획분 424.4 g을 얻었다.



Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of *Ecklonia stolonifera*.

3-2. 활성성분 분리

곰피의 ethanol 추출물과 각 분획물에 대하여 acetylcholinesterase 억제활성, lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성에서 EtOAc 분획물은 가장 높은 활성이 나타났으며, butyrylcholinesterase 억제활성에서는 분획물들 중에서 *n*-hexane 분획물이 가장 큰 억제활성이 나타났다. 이에 *n*-hexane 분획물과 EtOAc 분획물을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성성분을 분리하였으며, 그 과정을 Scheme 2와 3에 나타내었다.

3-2-1. *n*-Hexane 획분의 활성성분 분리

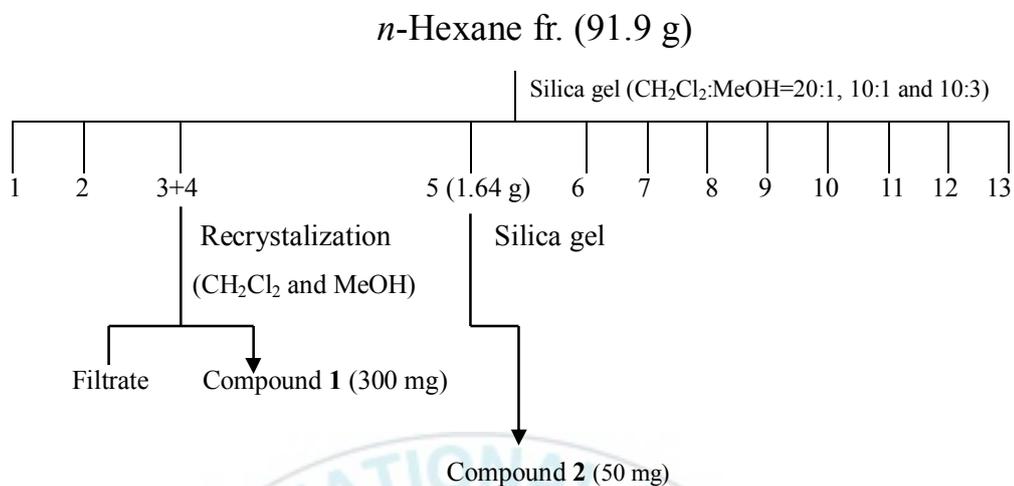
곰피의 분획물들 중 butyrylcholinesterase 억제활성이 가장 뛰어난 *n*-hexane 분획물 (91.9 g)을 CH₂Cl₂:MeOH (20:1, 10:1, 10:3)로 silica gel column chromatography를 수행하여 13개의 subfractions (HF1~ HF13)으로 나누었다. HF3과 HF4를 합한 후, CH₂Cl₂과 MeOH로 재결정하여 compound **1** (300 mg)을 얻었다. HF5 (1.64 g)을 *n*-hexane:EtOAc (5:1)로 silica gel column chromatography하여 compound **2** (50 mg)를 얻을 수 있었다.

3-2-2. EtOAc 획분의 활성성분 분리

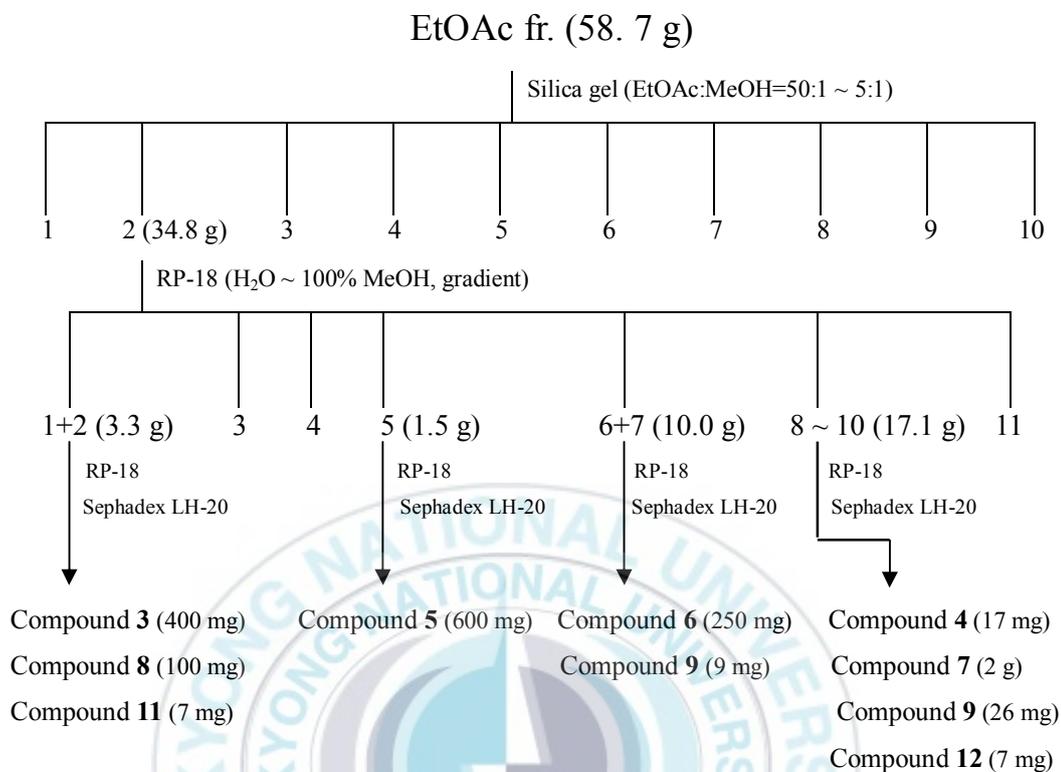
Acetylcholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 그리고 간보호 활성에서 가장 효과가 뛰어난 EtOAc 분획물 (58.7 g)을 EtOAc:MeOH (50:1 ~ 5:1)로 silica gel column chromatography를 수행하여 10개의 subfractions (EF1 ~ EF10)으로 나누었다. EF2 (34.8 g)을 RP-18 column chromatography (H₂O ~ 100% MeOH, gradient)하여 11개의 subfractions을 얻었다. EF2-(1+2) (3.3 g)를 RP-18 (20% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)과 반복적인 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 하여 compounds **3** (400 mg), **8** (100 mg), **11** (8 mg)을 분리하였다. EF2-5 (1.5 g)을 반복적인 RP-18 column chromatography (10% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)와 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 compound **5** (600 mg)

를 얻었다. EF2-(6+7) (10.0 g)을 RP-18 column chromatography (10% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)와 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 compounds **6** (250 mg)과 **9** (9 mg)를 얻었다. 또한 EF2-(8~10) (17.1 g)을 RP-18 column chromatography (H₂O ~ 100% MeOH, gradient)와 반복적인 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 compounds **4** (17 mg), **7** (2 g), **9** (26 mg), **12** (7 mg)를 얻었다.





Scheme 2. Isolation of compounds **1** and **2** from the *n*-hexane fraction of *Ecklonia stolonifera*.



Scheme 3. Isolation of compounds 3-12 from the EtOAc fraction of *Ecklonia stolonifera*.

3-3. 곰피에서 분리된 화합물 1-12의 분광학적 성질

Compound **1** (fucosterol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **2** (24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **3** (phloroglucinol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **4** (dioxinodehydroeckol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **5** (eckol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **6** (phlorofucofuroeckol-A)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **7** (dieckol)

: The compound was identified by TLC with an authentic sample.

Compound **8** (triphloretol-B): Pale brown powder, $C_{18}H_{14}O_9$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.94 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-3), 5.84 (2H, s, H-3'', 5''), 5.82 (2H, d $J=1.9$ Hz, H-2', 6'), 5.80 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-4'), 5.52 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-5). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.7 (C-1'), 158.7 (C-3', 5'), 154.6 (C-4''), 154.3 (C-4), 153.1 (C-6), 151.1 (C-2, 2'', 6''), 123.3 (C-1), 122.3 (C-1''), 96.2 (C-3), 95.7 (C-4'), 94.8 (C-3'', 5''), 94.1 (C-2', 6'), 92.8 (C-5). [Fukuyama *et al.*, 1989]

Compound **9** (2-phloroeckol): Pale brown powder, $C_{24}H_{16}O_{12}$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.96 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 5.86 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2', 6'), 5.84 (2H, s, H-3'', 5''), 5.84 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-4'), 5.82 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-6), 5.80 (1H, s, H-3). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.7 (C-1'), 159.2 (C-3', 5'), 155.1 (C-4''), 153.5 (C-7), 151.6 (C-2'', 6''), 148.1 (C-2), 146.5 (C-9), 142.9 (C-5a), 142.0 (C-4), 137.5 (C-10a), 124.7 (C-4a), 123.0 (C-1, 9a), 122.4 (C-1''), 99.1 (C-7), 96.8 (C-4'), 96.4 (C-3), 95.3 (C-3'', 5''), 94.5 (C-2', 6'), 94.3 (C-6). [Fukuyama *et al.*, 1985]

Compound **10** (7-phloroeckol): Pale brown powder, $C_{24}H_{16}O_{12}$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.61 (1H, s, 9-OH), 9.40 (1H, s, 4-OH), 9.20 (1H, s, 2-OH), 9.12 (4H, d, $J=6.3$ Hz, 3', 5'-OH, 2'', 6''-OH), 9.00 (1H, s, H-4''), 6.14 (1H, s, H-3), 6.01 (1H, d, $J=3.1$ Hz, H-8), 5.86 (2H, s, H-3'', 5''), 5.80 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-4'), 5.79 (1H, d, $J=3.1$ Hz, H-6), 5.72 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2', 6'). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.3 (C-1'), 158.8 (C-3', 5'), 154.8 (C-4''), 154.5 (C-7), 151.2 (C-2'', 6''), 146.0 (C-9), 145.9 (C-2), 142.3 (C-5a), 141.8 (C-4), 137.1 (C-10a), 123.9 (C-9a), 123.1 (C-4a), 122.5 (C-1''), 122.2 (C-1), 98.9 (C-3), 98.3 (C-8), 96.2 (C-4'), 94.8 (C-3'', 5''), 93.6 (C-2', 6'), 93.4 (C-6). [Okada *et al.*, 2004]

Compound **11** (diphlorethol): Pale brown powder, $C_{12}H_{10}O_6$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.05 (2H, s, 3', 5'-OH), 9.01 (2H, s, 2, 6-OH), 8.94 (1H, s, 4-OH), 5.84 (2H, s, H-3, 5), 5.76 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-4'), 5.66 (2H, d, $J=1.8$ Hz, H-2', 6'). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.7 (C-1'), 158.6 (C-3', 5'), 154.5 (C-2, 6), 151.2 (C-4), 122.6 (C-1), 95.6 (C-4'), 94.8 (C-3, 5), 93.7 (C-2', 6'). [Fukuyama *et al.*, 1989]

Compound **12** (fucufuroeckol-A): Pale brown powder, $C_{24}H_{14}O_{11}$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.05 (1H, s, 14-OH), 9.88 (1H, s, 4-OH), 9.76 (1H, s, 10-OH), 9.44 (1H, s, 2-OH), 9.18 (2H, s, 3', 5'-OH), 8.22 (1H, s, 8-OH), 6.71 (1H, s, H-13), 6.47 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-11), 6.29 (1H, s, H-3), 6.25 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-9), 5.83 (1H, s, H-4'), 5.76 (2H, d, $J=1.5$ Hz, H-2', 6'). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.7 (C-1'), 158.8 (C-3',

5'), 158.3 (C-11a), 157.6 (C-10), 150.5 (C-12a), 150.2 (C-8), 146.9 (C-2), 144.4 (C-14), 142.0 (C-4), 136.8 (C-15a), 133.6 (C-5a), 126.1 (C-14a), 122.6 (C-4a), 122.4 (C-1), 103.1 (C-6), 102.4 (C-7), 98.2 (C-3), 98.0 (C-9), 96.3 (C-4'), 94.6 (C-13), 93.7 (C-2', 6'), 90.5 (C-11).



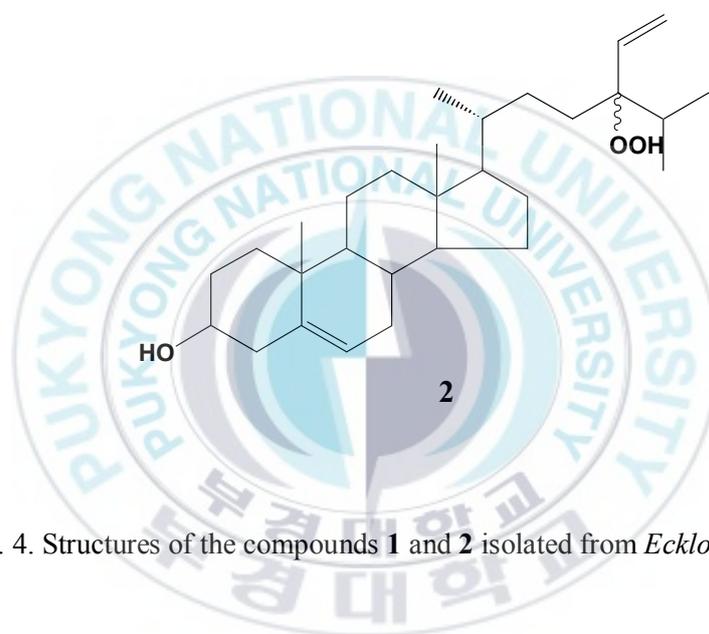
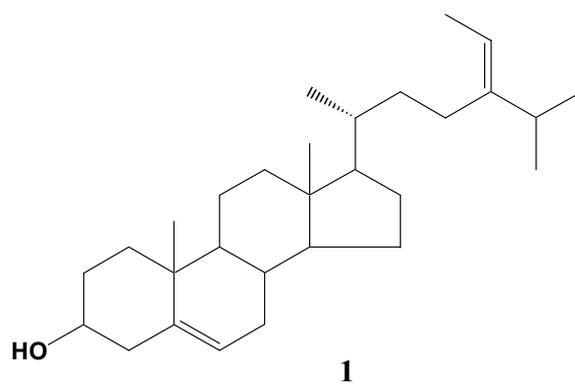


Fig. 4. Structures of the compounds **1** and **2** isolated from *Ecklonia stolonifera*.

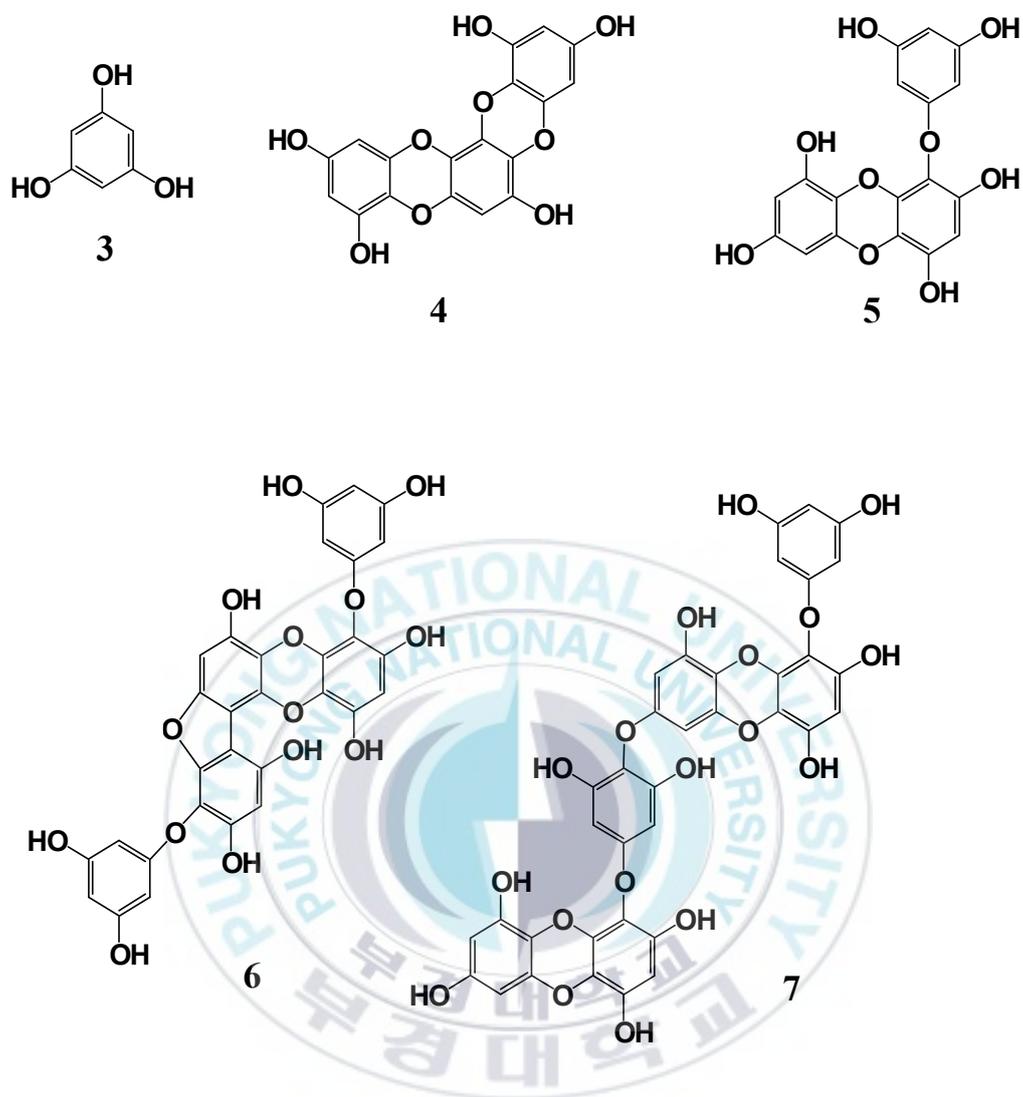


Fig. 5. Structures of the compounds 3-7 isolated from *Ecklonia. stolonifera*.

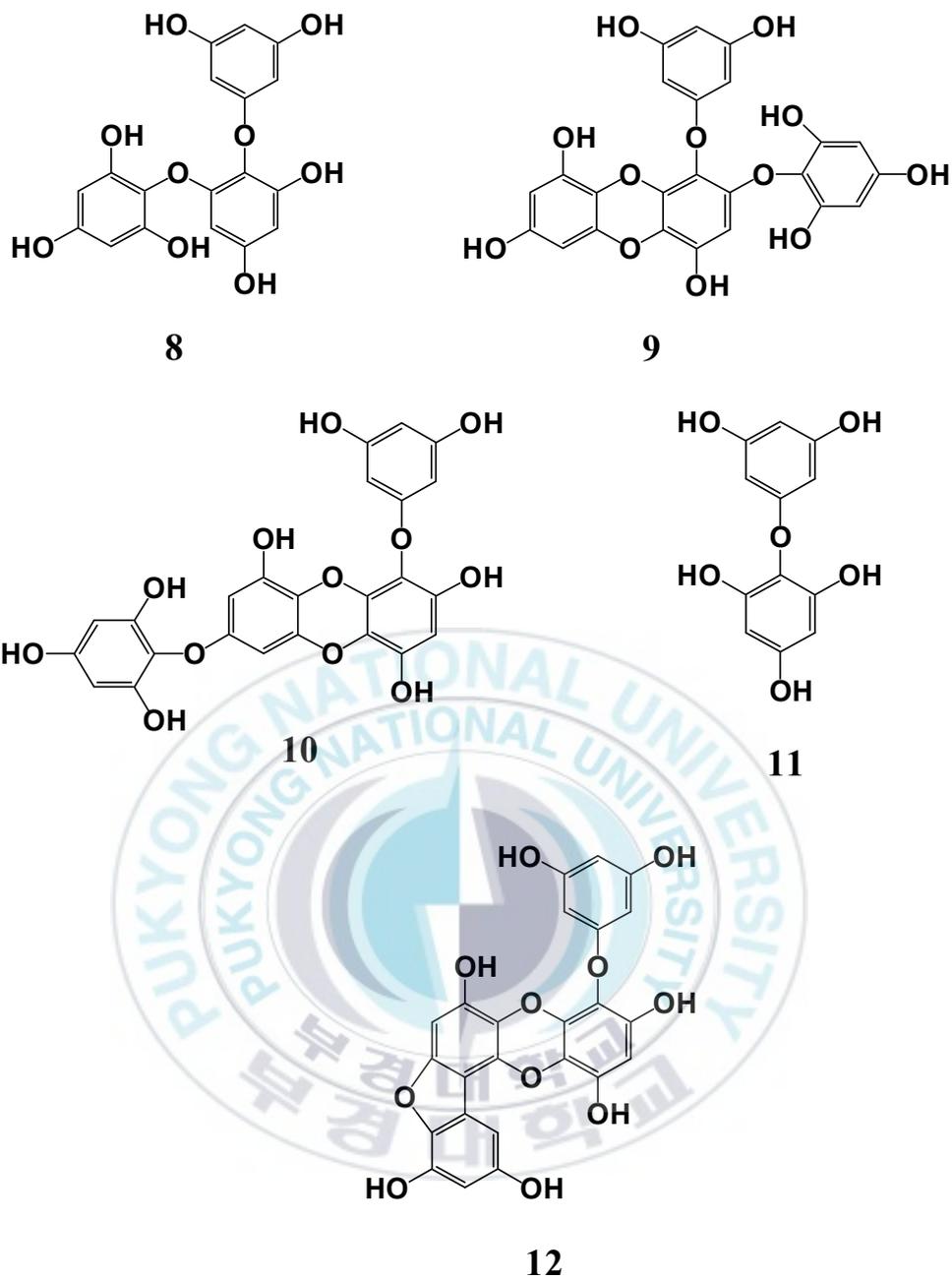


Fig. 6. Structures of the compounds **8-12** first isolated from *Ecklonia stolonifera*.

3-4. 생리활성 실험

3-4-1. *in vitro* 실험

3-4-1-1. Cholinesterase 억제활성 실험

Cholinesterase 억제활성은 Ellman *et al.* (1961)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. Acetylthiocholine과 butyrylthiocholine을 기질로 이용하는 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase의 억제활성을 측정하였다. 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 140 μ l, 시료 20 μ l와 acetylcholinesterase (0.36 U) 혹은 butyrylcholinesterase (0.36 U) 20 μ l를 각각 96 well microplate에 넣고 실온에서 15분간 배양한 후에 10 μ l의 DTNB [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]와 기질인 acetylthiocholine 혹은 butyrylthiocholine 10 μ l를 넣어 최종적으로 반응액이 200 μ l이 되도록 96 well plate에 넣는다. 이때, DTNB와 기질인 acetylthiocholine 혹은 butyrylthiocholine을 넣어야 효소반응이 시작되고, acetylthiocholine 혹은 butyrylthiocholine이 효소적 가수분해에 의해 생성되는 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성되는 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate anion (Fig. 7)을 microplate reader VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 412 nm에서 15분간 측정하였다.

Cholinesterase 억제 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{Sam}} - A_{\text{Cont}}) / A_{\text{Std}}\} \times 100$$

A_{Sam} : 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

A_{Cont} : 측정시료를 넣고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도

A_{Std} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

각각의 측정시료의 cholinesterase 억제활성을 IC_{50} value로 나타내었다. 이는 기

질인 acetylthiocholine과 butyrylthiocholine의 가수분해를 50% 억제하는 농도를 $\mu\text{g/ml}$ 혹은 μM 로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.



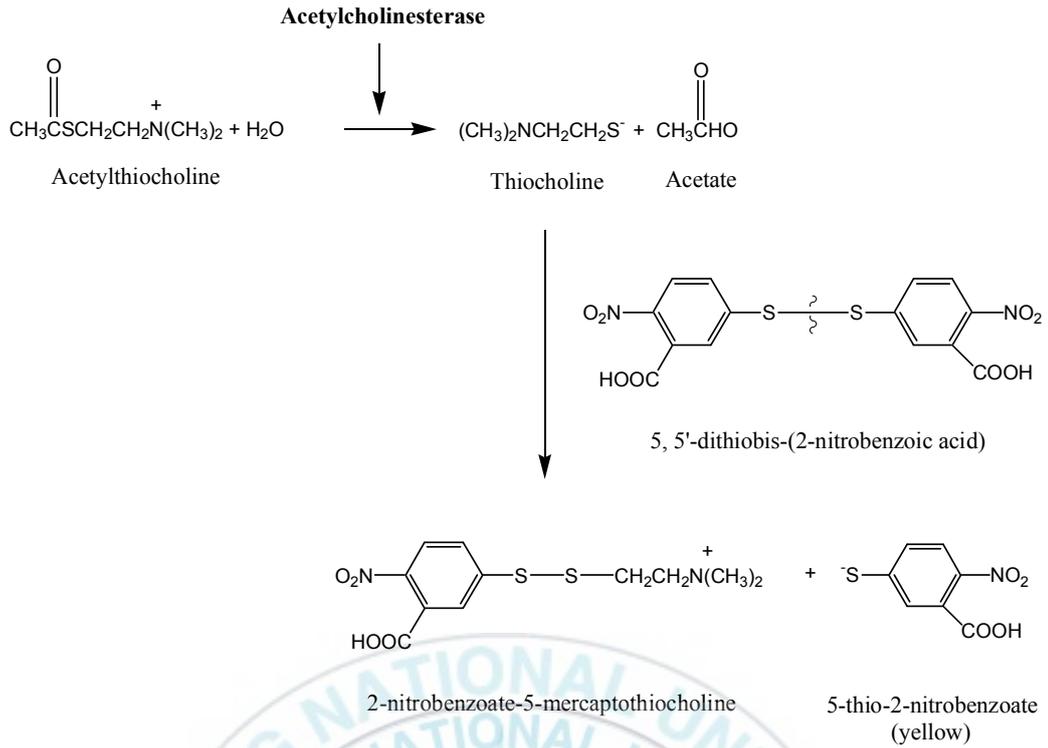


Fig. 7. Mechanism of the cholinesterase assay (Ellman *et al.*, 1961).

140 μ l Sodium phosphate buffer (pH 8.0) + 20 μ l enzyme + 20 μ l test sample



Incubation at room temperature for 15 min



Addition 10 μ l DTNB

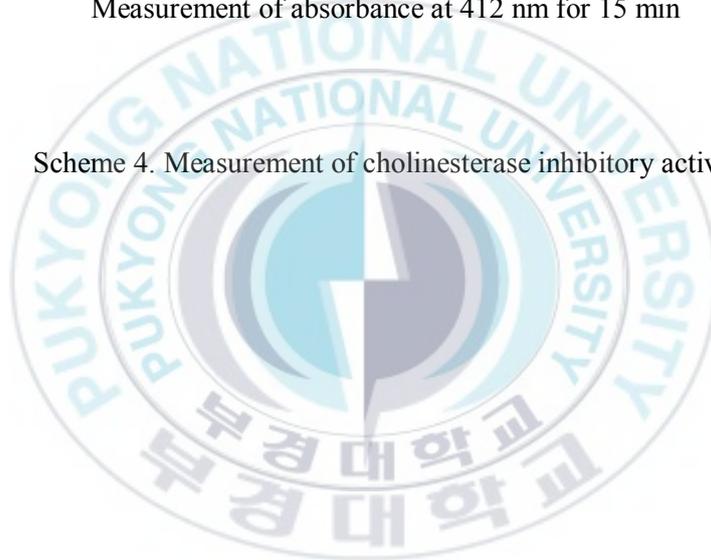


Addition 10 μ l acetylthiocholine or butyrylthiocholine



Measurement of absorbance at 412 nm for 15 min

Scheme 4. Measurement of cholinesterase inhibitory activity.



3-4-1-2. Lens aldose reductase 억제활성 실험

Lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman과 Kinoshita (1965)가 발표한 방법을 변형하여 사용하였다. 흰쥐의 안구에서 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량 [수정체 1개당 sodium phosphate buffer (pH 6.2) 0.5 ml 첨가]의 sodium phosphate buffer (pH 6.2)를 가하여 균질화하였다. 이를 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심 분리한 후, 그 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 1.5 ml 석영 큐벳에 potassium phosphate buffer (pH 7.0) 621 μ l, 효소 90 μ l, 조효소인 NADPH (1.6 mM) 90 μ l, DMSO에 녹인 측정시료 9 μ l를 넣고, 마지막으로 기질인 DL-glyceraldehyde (50 mM)를 90 μ l를 넣어 총 반응액이 900 μ l가 되도록 하여 340 nm에서 4분간 spectrophotometer를 측정하여 NADPH의 감소율을 측정하였다 (Fig. 8).

Lens aldose reductase 억제 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 4\text{분 흡광도}) / 4 (\text{측정시간})\} \times 10,000$$

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{Cont}} - A_{\text{Sam}}) / A_{\text{Cont}}\} \times 100$$

A_{Sam} : 측정시료를 넣었을 때의 측정값

A_{Cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 측정값

각각의 측정시료의 lens aldose reductase 억제활성을 IC_{50} value로 나타내었다. 이는 조효소인 NADPH의 감소를 50% 억제하는 농도를 μ g/ml 혹은 μ M로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.

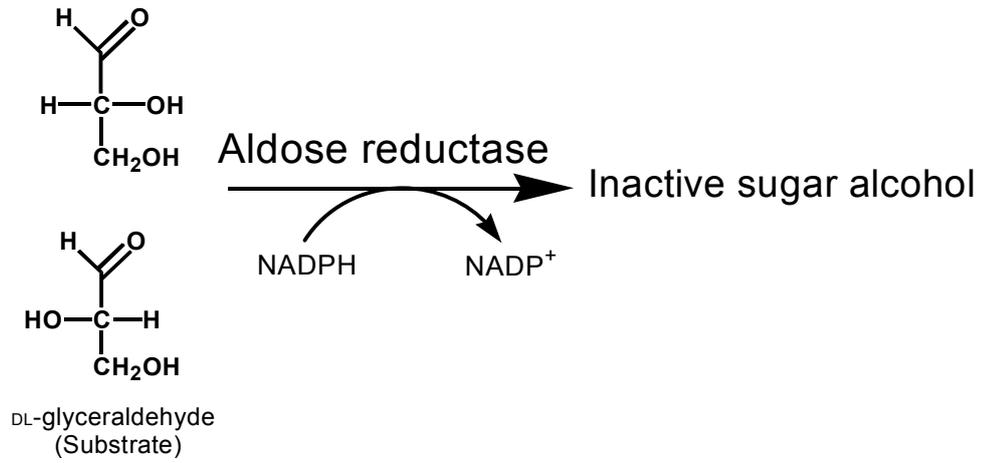
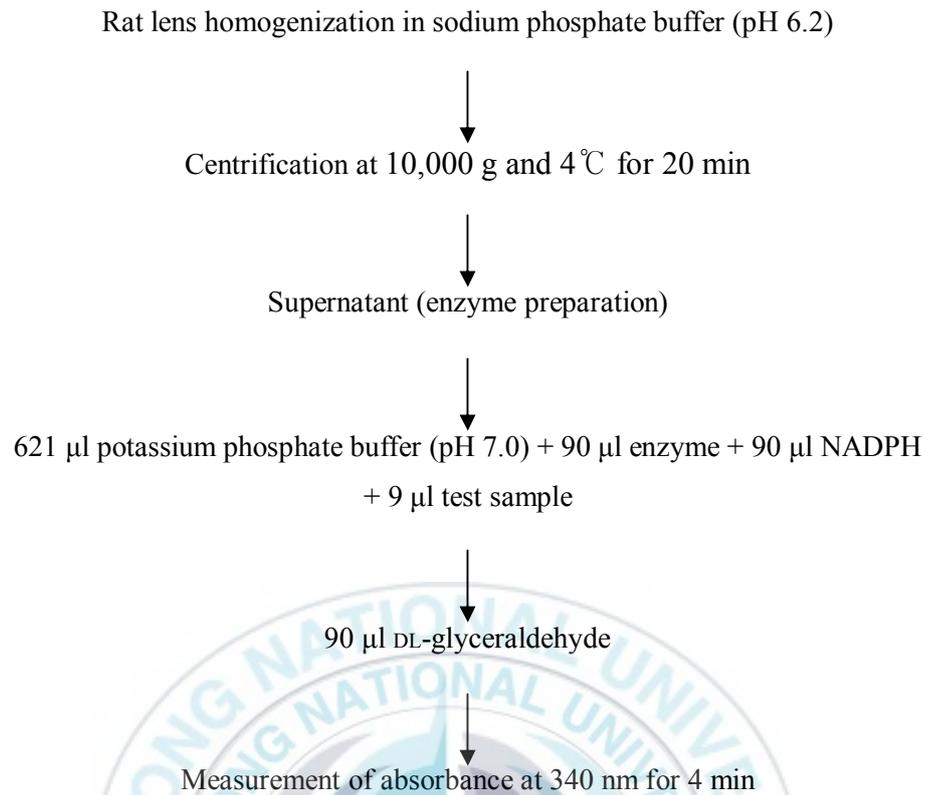


Fig. 8. Mechanism of the lens aldose reductase assay (Hayman and Kinoshita, 1965).





Scheme 5. Measurement of lens aldose reductase inhibitory activity.

3-4-1-3. 간보호 활성 실험

Tacrine으로 유도한 간세포 독성 실험은 Song *et al.* (2001)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. American Type Culture Collection으로부터 인간의 간암 세포종인 Hep G2 cell을 구입하여 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 IU/ml)와 streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 RPMI 배지에 well당 2×10^5 개의 세포를 넣고, 37°C의 CO₂ incubator에서 배양한다. MTT법 (Fig. 9)을 이용하여 세포독성을 측정하였는데, 1.2 mM의 tacrine을 넣거나 혹은 넣지 않은 배지에 2시간 동안 세포를 배양하고, 3개의 다른 농도 (추출물 혹은 분획물: 100, 200, 300 µg/ml, 화합물: 10, 50, 100 µg/ml)의 시료를 넣고, 세포 생존율을 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 측정시료의 tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 보호 효과는 50% 세포 생존율 농도인 EC₅₀ value로 나타내었다. 이는 tacrine으로 유도된 각각의 control 대한 50% 세포 생존율 농도를 µg/ml 혹은 µM로 나타낸 값으로 concentration-inhibition curve로 얻었다.

간세포 독성에 대한 세포 생존율은 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = (A_{\text{Cont}} - A_{\text{Sam}}) \times 100$$

A_{Sam}: 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

A_{Cont}: 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

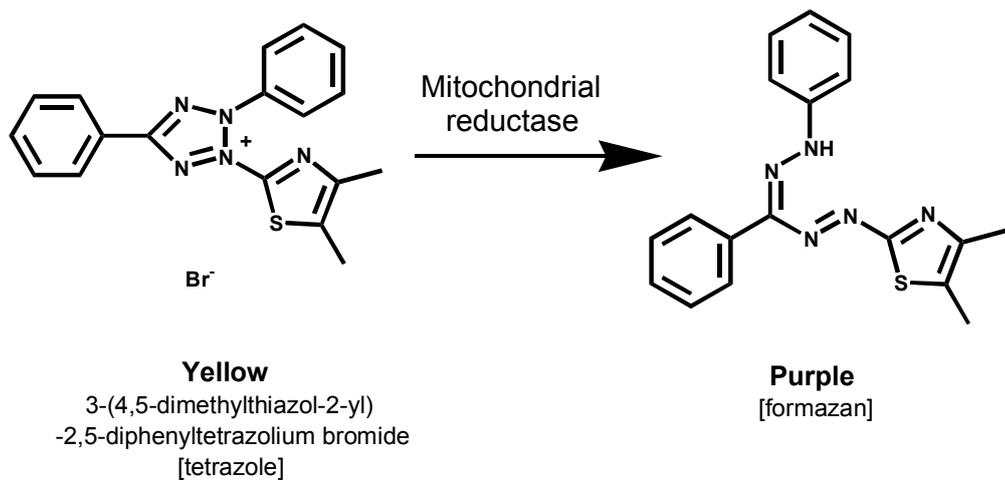
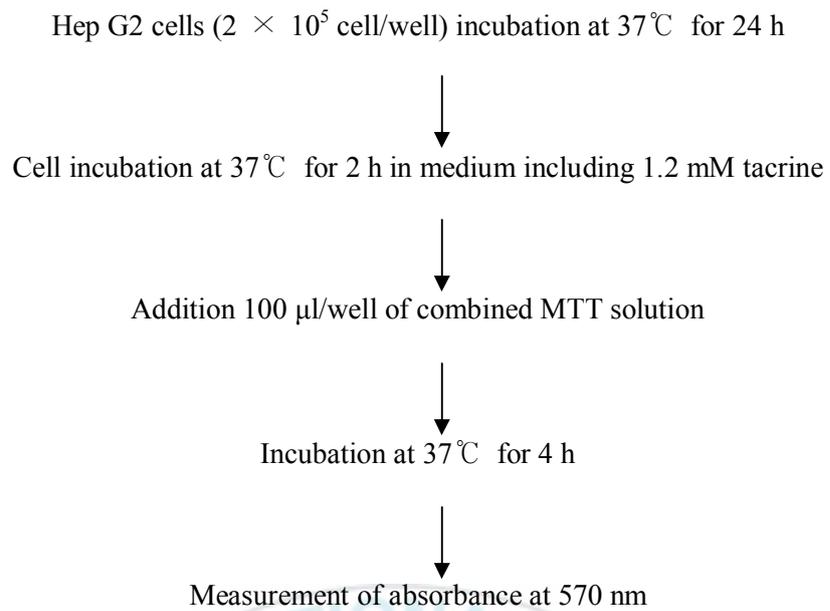
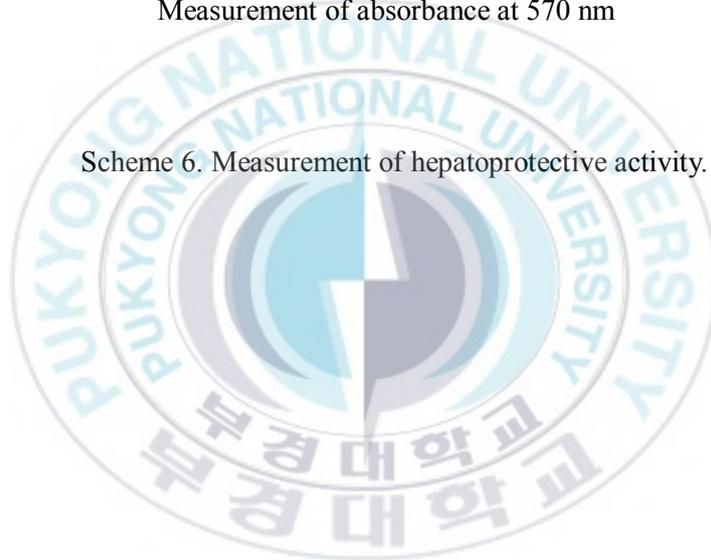


Fig. 9. Mechanism of the MTT assay (Mosmann, 1983).





Scheme 6. Measurement of hepatoprotective activity.



3-4-2. *in vivo* 실험

3-4-2-1. 고지혈증 억제활성 실험

3-4-2-1-1. 실험동물

실험동물은 4 주령의 120 ~ 130 g의 수컷 Sprague-Dawley (SD)계 쥐를 Samtaco Bio Korea Ltd. (Korea)로부터 구입하였다. 실험동물은 온도 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 상대습도 ($50 \pm 10\%$)와 light:dark cycle이 12시간 간격이 되도록 조절되는 동물 사육실에서 10일에서 14일간 정상사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하면서 예비 사육하였으며, 실험동물이 체중이 200 ± 5 g이 되면 본 실험을 실시하였다.

3-4-2-1-2. Poloxamer 407로 유발한 고지혈증 모델 흰쥐

체중이 200 ± 5 g 정도되는 예비 사육한 실험동물을 7 마리씩 측정시료 수에 맞게 군을 나눈다. 실험동물을 6시간 절식시킨 후, poloxamer 407을 400 mg/kg의 농도로 1회 복강투여하고 2시간 후에 식염수에 녹인 측정시료를 용량별로 1일 1회, 3일간 경구투여하였다.

3-4-2-1-3. 고콜레스테롤 식이로 유발한 고콜레스테롤혈증 모델 흰쥐

실험동물의 혈중 콜레스테롤을 수치를 증가시키기 위한 고콜레스테롤 식이 제조는 일반사료에 (crude carbohydrate 48.3% (wt/wt), crude protein 23.5%, crude fat 5.9%, crude ash 5.9%, crude fiber 3.9% [Sam #31, Samtako Inc.]), cholic acid, 콜레스테롤과 olive oil을 950:5:20:25의 비율로 혼합하여 조제하였으며, 조제한 식이는 고형으로 만들어 60°C 에서 열풍 건조하여 냉동 보관하면서 공급하였다 (Ro *et al.*, 1994). 모든 실험동물에 고콜레스테롤 식이를 7일간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 고콜레스테롤혈증 유발여부를 확인하기 위하여, 쥐의 미정맥으로부터 혈액을 채취하여, cholesterol assay kit (Cholestezyme-V)로 총 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 유발이 확인된 쥐는 유발 정도에 따라

7마리씩 군을 나누어 식염수에 녹인 측정시료를 1일 1회, 3일간 경구투여 하였다.

3-4-2-1-4. 혈액채취

실험동물에 측정시료의 마지막 경구투여 후, 12시간 절식시킨다. Ethyl ether로 마취시켜 단두하여 혈액을 채취한다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후, 4℃에서 3000 g의 속도로 10분간 원심분리하여 상층액인 혈청을 분리하였다. 혈청은 -70℃의 deep freezer에 바로 넣어 보관하였다.

3-4-2-1-5. 생화학 활성실험

Poloxamer 407과 고콜레스테롤 식이로 유발된 고지혈증과 고콜레스테롤혈증 쥐의 혈청 지질성분 (중성지질, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤)을 Shinyang Chemical Co. Ltd. (Korea)에서 구입한 kits 시약을 이용하여 enzymatic colorimetric 방법에 따라 측정하였다.

3-4-2-1-5-1. 총 콜레스테롤 농도 측정

총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC) 농도는 정량용 kit시약 (Cholestezyme-V)으로 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 조제한 반응시약을 3 ml씩 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 37℃의 water bath에서 5분간 반응시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 혈청의 콜레스테롤 농도를 구하였다.

$$\text{Total cholesterol (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 300$$

3-4-2-1-5-2. 중성지질 농도 측정

혈청의 중성지질 (triglyceride, TG) 농도는 triglyceride kit 시약 (Triglyzyme-

V)으로 측정하였다. 실험방법은 총 콜레스테롤 측정법과 동일하고, 중성지질 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 505 nm에서 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 혈청의 중성지방 농도를 계산하였다.

$$\text{Triglyceride (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 300$$

3-4-2-1-5-3. HDL 콜레스테롤 농도 측정

혈청의 HDL 콜레스테롤 (HDL cholesterol, HDL-C) 농도는 정량용 HDL 콜레스테롤 kit (HDL-C555)로 측정하였다. 실험방법은 분리한 혈청 0.2 ml에 분리시약 0.2 ml을 넣어 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치한 후, 4℃에서 3000 g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 50 μ l 취하여 조제한 반응시약 3 ml씩을 첨가하여 만들고, 표준액은 콜레스테롤 측정법과 동일한 방법으로 만들어 vortex mixer로 혼합한다. 혼합액은 37℃의 water bath에서 5분간 반응시켜 60분 이내에 파장 555 nm에서 흡광도를 측정하고, 시료의 흡광도 값을 다음 식을 이용하여 HDL 콜레스테롤 농도를 구하였다.

$$\text{HDL cholesterol (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 50 \times 2$$

3-4-2-1-5-4. LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화지수 (A.I.)

LDL 콜레스테롤 (LDL cholesterol, LDL-C) 수치와 동맥경화지수 (atherogenic index, A.I.)는 위의 방법으로 측정한 TG, TC, HDL-C 값을 이용하여 다음의 방정식으로 그 값을 구하였다 (Kim *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 1991).

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C} - \frac{1}{5} \text{TG}$$

$$\text{A.I.} = (\text{TC} - \text{HDL-C}) / \text{HDL-C}$$

3-4-2-1-6. 통계처리

모든 측정결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 유의성은 Student's *t*-test (Systat In., Evaston, III., U.S.A)로 검증하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 로 나타내었다.



III. 결과 및 고찰

1. 곰피에서 분리된 화합물의 구조 결정

1-1. *n*-Hexane 획분에서 분리된 화합물의 구조 결정

곰피 ethanol 추출물과 분획물 중 butyrylcholinesterase 억제활성이 가장 높은 *n*-hexane 가용성 분획물을 silica gel column chromatography와 재결정을 통하여 두 개의 가지 compounds **1**과 **2** (Fig. 4)를 분리하였다.

Compound **1** (fucosterol)은 흰색의 무정형의 결정으로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 fucosterol임을 확인하였다. 이 화합물은 *Turbinaria ornate*, *Sargassum carpophyllum*, *Pelvetia siliquosa* 등의 해조류로부터 분리되었으며, 항당뇨 활성 (Lee *et al.*, 2004b), 항산화 활성 (Lee *et al.*, 2003), 암세포 종에 대한 세포독성 효과 (Tang *et al.*, 2002), angiotensin-converting enzyme 억제효과 (Hagiwara *et al.*, 1986)가 알려져 있다.

Compound **2** (24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol)는 흰색의 무정형의 결정으로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol임을 확인하였다. 이 화합물은 *Turbinaria ornate*와 *Sargassum carpophyllum* 등의 해조류로부터 분리되었으며, 암세포 종에 대한 세포독성 효과 (Sheu *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2002)가 알려져 있다.

1-2. EtOAc 획분에서 분리된 화합물의 구조 결정

곰피 ethanol 추출물과 분획물들 중 acetylcholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 간보호 활성에서 가장 효과가 뛰어난 EtOAc 가용성 분획물을 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 이용하여 10개의 compounds **3-12** (Fig. 5 and 6)를 분리하였다. 이들의 구조는 ^1H 과 ^{13}C -NMR 등의 분광학적 data와 문헌치를 비교하여 구조를 결정하였으며, 분리된 화합물 중 compounds **8-11**는 다른 갈조류에서 보고된 바 있으나, 곰피에서는 처음으로 보고되는 성분이며, compound **12**는 *Eisenia arborea*에서 acetylation된 hepta-acetate 상태로 분리되었으나, free형은 천연물에서는 처음으로 분리한 화합물이다.

Compound **3** (phloroglucinol)은 무색의 침상형의 결정으로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 phloroglucinol임을 확인하였다. 이 화합물은 ROS 생성억제 (Kang *et al.*, 2004a), DPPH 소거활성 (Kang *et al.*, 2003a), peroxynitrite 소거활성 (Chung *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2006), tyrosinase 억제활성 (Kang *et al.*, 2004b), 뿐만 아니라 피부 진피에 존재하고, 피부의 탄력을 유지하게 하는 elastin을 분해하는 elastase 억제활성 및 염증과 관련있는 hyaluronidase 억제효과 (Bu *et al.*, 2006) 등이 알려져 있다.

Compound **4** (dioxinodehydroeckol)는 연한 회색의 무정형 분말로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 dioxinodehydroeckol임을 확인하였다. 이 화합물은 DPPH와 ONOO \cdot 소거활성이 알려져 있다 (Kang *et al.*, 2003a; Jung *et al.*, 2006).

Compound **5** (eckol)는 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 eckol임을 확인하였다. 이 화합물은 DPPH와 ONOO \cdot 와 같은 radical 소거활성 (Kang *et al.*, 2003a; Jung *et al.*, 2006), 산화적 손상으로 유도되는 폐의 섬유모세포에서 세포 손상억제 (Kang *et al.*, 2005a), 자외선 조사에 의한

collagen의 분해와 인간의 진피 섬유 모세포에서 합성되는 피부연결조직을 손상시키는 matrix metalloproteinase를 억제하며 (Joe *et al.*, 2006), anti-plasmin 효과 (Fukuyama *et al.*, 1985)가 알려져 있으며, 뿐만 아니라 당뇨병과 당뇨 합병증의 지표인 α -amylase와 glycation의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Okada *et al.*, 2004).

Compound 6 (phlorofucofuroeckol-A)은 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 phlorofucofuroeckol-A임을 확인하였다. 이 화합물은 DPPH와 ONOO⁻ 소거활성이 알려져 있다 (Kang *et al.*, 2003a; Jung *et al.*, 2006).

Compound 7 (dieckol)은 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 표준품과 비교 TLC하여 dieckol임을 확인하였다. 이 화합물은 radical 소거활성 (Kang *et al.*, 2003a; Jung *et al.*, 2006)과 α -amylase와 glycation 생성 억제활성이 알려져 있다 (Okada *et al.*, 2004).

Compound 8 (triphlorethol-B)은 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 용매 DMSO-*d*₆로 ¹H-NMR (Fig. 10)과 ¹³C-NMR (Fig. 11) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Fukuyama *et al.*, 1989). ¹H-NMR spectrum에서 7개의 aromatic 수소 [δ : 5.94 (1H, d, *J*=2.7 Hz), 5.84 (2H, s), 5.82 (2H, d, *J*=1.9 Hz), 5.80 (1H, d, *J*=1.9 Hz), 5.52 (1H, d, *J*=2.7 Hz)]와 ¹³C-NMR spectrum에서 치환되지 않은 7개의 탄소와 11개의 산소를 가진 aromatic 탄소의 존재로 3개의 phloroglucinol unit로 구성된 화합물임을 알 수 있었으며, eckol의 구조와는 달리 C-5와 C-2" 사이에 aryl-ether 결합이 없는 opened-chain 구조를 형성하는 화합물로서 triphlorethol-B로 구조결정 하였다. 이 화합물은 *Ecklonia kurome*로부터 분리되었으나 곰피에서는 처음 분리된 화합물이다 (Fukuyama *et al.*, 1989). 이 화합물은 ONOO⁻ 소거활성 (Jung *et al.*, 2006)과 H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 보호효과와 폐의 섬유모세포 보호효과 (Kang *et al.*, 2005b) 그리고 이온화 조사에 대한

보호효과 (Kang *et al.*, 2006) 등이 알려져 있다.

Compound **9** (2-phloroeckol)는 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 13)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 14) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Fukuyama *et al.*, 1985). $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.86 (2H, d, $J=2.0$ Hz)과 5.84 (1H, d, $J=1.9$ Hz)에서 AB_2 system, δ 5.96 (1H, d, $J=2.3$ Hz)과 5.82 (1H, d, $J=2.7$ Hz)에서 AB system, δ 5.84 (2H, s)와 5.80 (1H, s)에서의 2개의 singlet은 8개의 aromatic 수소의 특징을 나타내는 proton signals이 나타났고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 8개의 치환되지 않은 탄소와 16개의 산소를 가지는 aromatic 탄소를 나타내므로 4개의 phloroglucinol unit가 존재함을 알 수 있었다. Proton과 carbon의 더 정확한 assignment를 위해서 HMQC (Fig. 15)와 HMBC (Fig. 16) 실험을 수행하였다. 이들 결과로부터 eckol의 골격에 추가적인 phloroglucinol unit의 정확한 위치는 C-2임을 알 수 있었다. 분광학적 data와 문헌치를 비교하여 이 화합물을 2-phloroeckol로 구조를 동정하였으며, 이 화합물은 *Ecklonia kurome*로부터 분리된 바 있으나, 곰피에서는 처음 분리된 화합물이다 (Fukuyama *et al.*, 1985).

Compound **10** (7-phloroeckol)은 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 17)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 18) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Okada *et al.*, 2004). $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.72 (2H, d, $J=2.0$ Hz)와 5.80 (1H, t, $J=2.0$ Hz)에서 AB_2 system, δ 5.79 (1H, d, $J=3.1$ Hz)와 6.01 (1H, d, $J=3.1$ Hz)에서 AB system, δ 5.86 (2H, s)과 6.14 (1H, s)에서의 두개의 singlet 뿐만 아니라 δ 9.00 (1H, s), 9.12 (4H, d, $J=6.3$ Hz), 9.20 (1H, s), 9.40 (1H, s), 9.61 (1H, s)에서 8개의 페놀성 -OH proton에 상응하는 proton signals이 나타났고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 8개의 치환되지 않은 탄소와 16개의 산소를 가지는 aromatic 탄소가 나타나므로 4개의 phloroglucinol units가 존재함을 알 수 있었다.

분광학적 data와 문헌치를 비교하여 이 화합물을 7-phloroeckol로 구조를 동정하였다. 이 화합물은 *Eisenia bicyclis*로부터 분리된 바 있으나, 곰피에서는 처음 분리된 화합물이며, α -amylase와 glycation 생성 억제활성이 알려져 있다 (Okada *et al.*, 2004).

Compound **11** (diphlorethol)은 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 19)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 20) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Fukuyama *et al.*, 1989). $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.76 (1H, t, $J=2.0$ Hz)과 5.66 (2H, d, $J=1.8$ Hz)에서 AB_2 system, 5.84 (2H, s)에서의 한개의 singlet, 뿐만 아니라 δ 9.05 (2H, s), 9.01 (2H, s), 8.94 (1H, s)에서 5개의 페놀성 -OH proton에 상응하는 proton signals이 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 5개의 치환되지 않은 탄소와 7개의 산소를 가지는 aromatic 탄소가 존재함으로 2개의 phloroglucinol units가 존재함을 알 수 있었다. HMBC (Fig. 21)를 측정하여 정확한 phloroglucinol unit의 결합위치를 확인하였고, 분광학적 data와 문헌치를 비교하여 이 화합물을 diphlorethol로 구조를 동정하였다. 이 화합물은 곰피에서는 처음 분리된 화합물이다 (Fukuyama *et al.*, 1989).

Compound **12** (fucofuroeckol-A)는 연한 갈색의 분말로 분리되었으며, 용매 DMSO- d_6 로 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 22), $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 23)과 HMQC (Fig. 24), HMBC (Fig. 25) spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치와 비교하였다 (Fukuyama *et al.*, 1990). $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 AB_2 system signals인 [δ 6.71 (1H, s)과 6.47 (1H, d, $J=1.10$ Hz)]와 [δ 6.25 (1H, d, $J=1.46$ Hz)와 5.76 (2H, d, $J=1.46$ Hz)]이 set를 이루고, 2개의 singlet [δ 6.29 (1H, s), 5.83 (1H, s)]과 8개의 phenolic hydroxyl signals (δ 10.05, 9.88, 9.76, 9.44, 9.18, 8.22)이 나타났고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 7개의 methine, 15개의 산소를 가지는 탄소, 2개의 4급 탄소 (δ 103.1, 102.4)로 구성된 24개의 aromatic 탄소를 가진다. 이들 spectra data를 통해서 이 화합물은 4개의 phloroglucinol units로 구성된 eckol-type phlorotannin임을 알 수 있었다. 4개의 phloroglucinol

units에서 A ring은 다른 units와 ether 결합을 하고 있으며, ether와 aryl-aryl 결합으로 구성되어 있는 다른 남아있는 units의 구조를 알기 위해서 eckol과 비교하였다. Eckol 구조에서 A와 B rings에 해당하는 carbon signals (C-1, 2, 3, 4, 4a, 10a, 1', 2', 3', 4', 5', 6')과 이 화합물의 A와 B rings의 carbon signals은 일치하므로, 한 개의 dibenzo-1,4-dioxin 골격을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 화합물의 C ring은 eckol의 C ring과 일치하지 않는데, 그것은 C ring에 한 개의 4급 탄소 (δ 103.1)가 존재하기 때문이다. 이 4급 탄소는 dibenzo-1,4-dioxin의 왼쪽 side ring에 속하는 것으로 나타났다. 게다가 추가되는 phloroglucinol unit D는 unit C와 aryl-aryl 결합을 통해서 연결되어 있으며, 이때 units C와 D 사이에 H₂O가 빠지면서 furan ring을 형성하게 된다. 분광학적 data와 문헌치를 비교하여 이 화합물을 fucofuroeckol-A로 구조를 동정하였다. 이 화합물은 *Eisenia arborea*에서 acylation에 의한 hepta-acetate형으로는 분리가 되었지만, free형은 천연물에서는 처음 분리되었다 (Glombitza and Gerstberger, 1985).



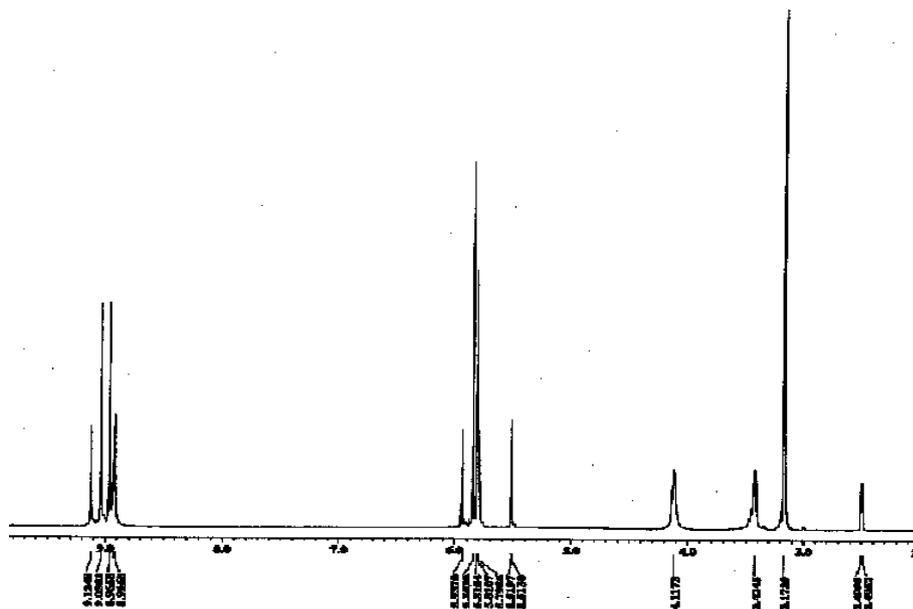


Fig. 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **8** in $\text{DMSO-}d_6$.

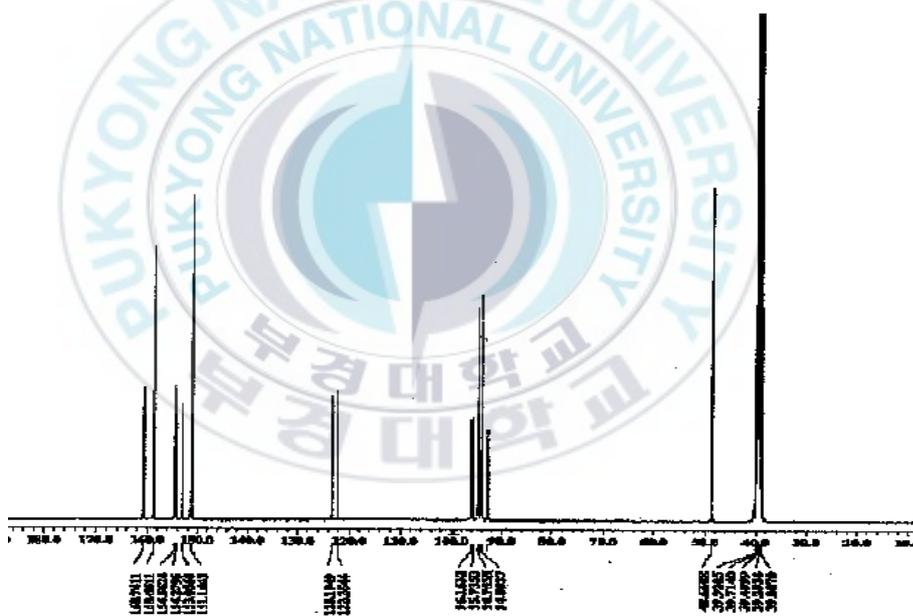


Fig. 11. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **8** in $\text{DMSO-}d_6$.

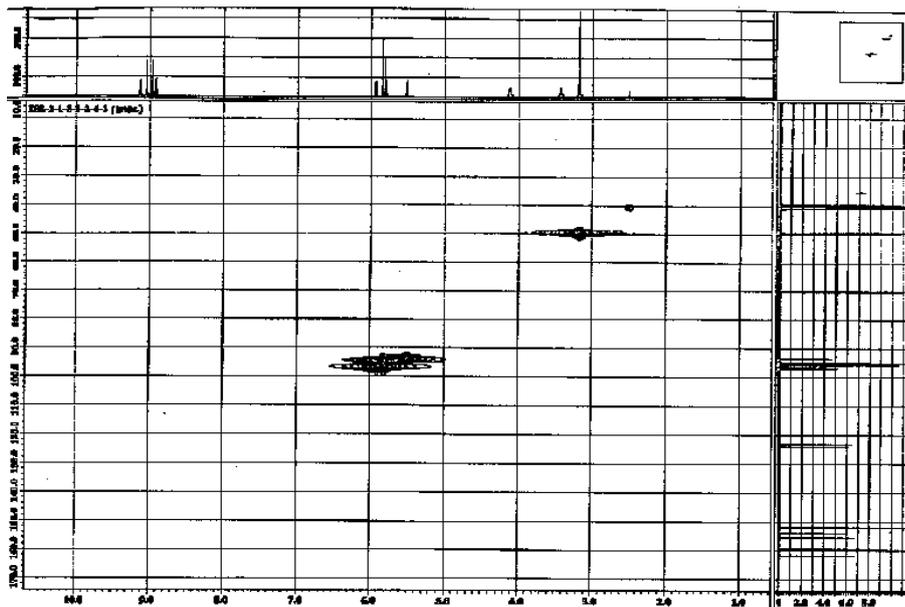
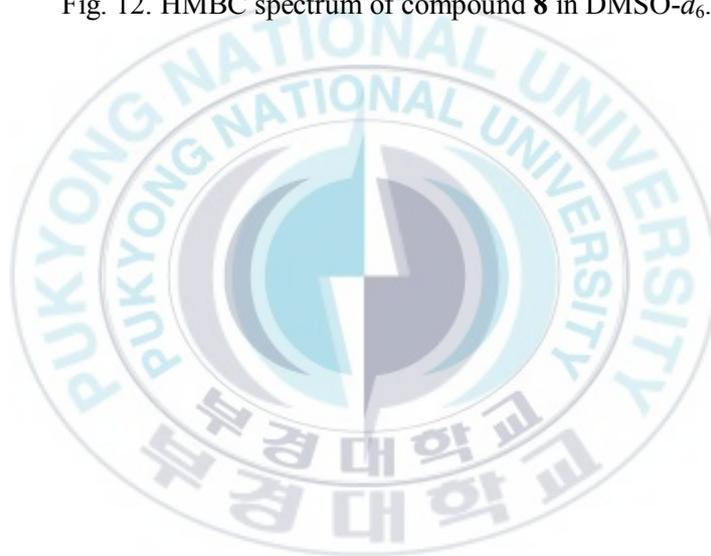


Fig. 12. HMBC spectrum of compound **8** in DMSO-*d*₆.



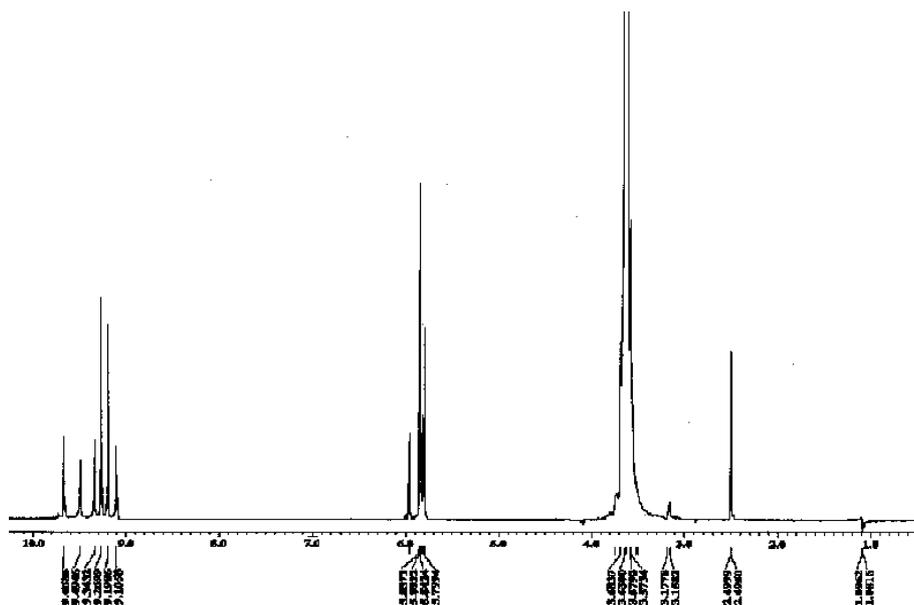


Fig. 13. ^1H -NMR spectrum of compound **9** in $\text{DMSO-}d_6$.

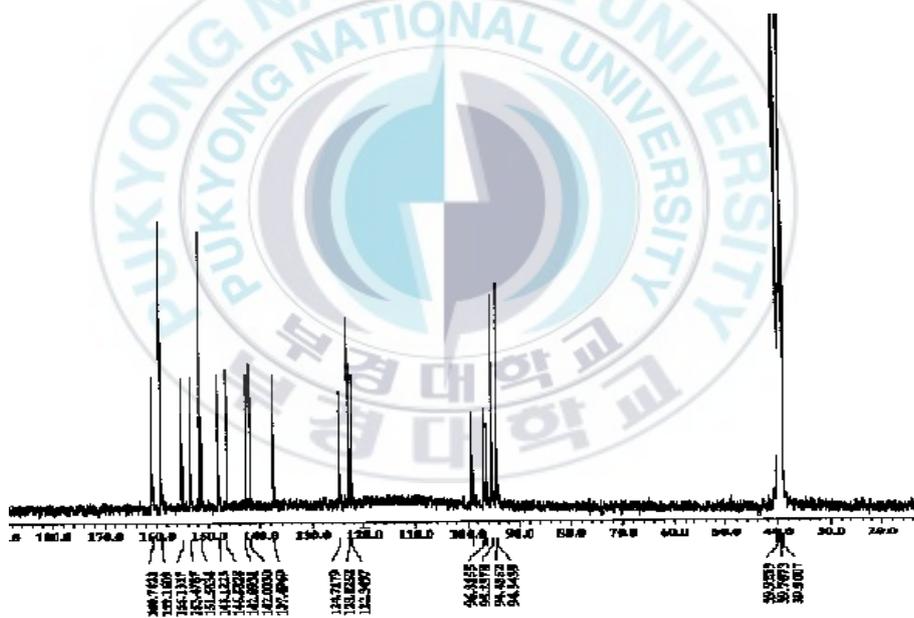


Fig. 14. ^{13}C -NMR spectrum of compound **9** in $\text{DMSO-}d_6$.

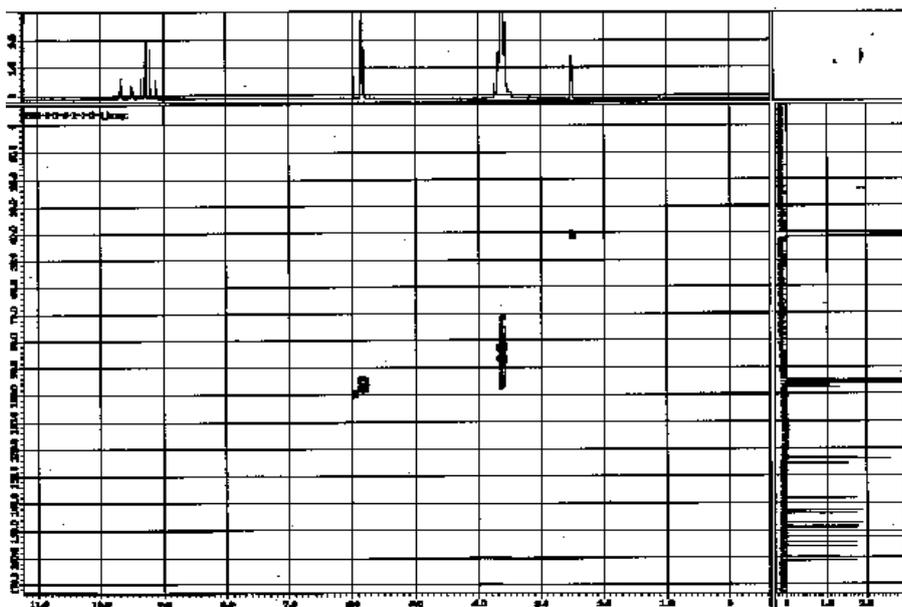


Fig. 15. HMOC spectrum of compound **9** in DMSO-*d*₆.

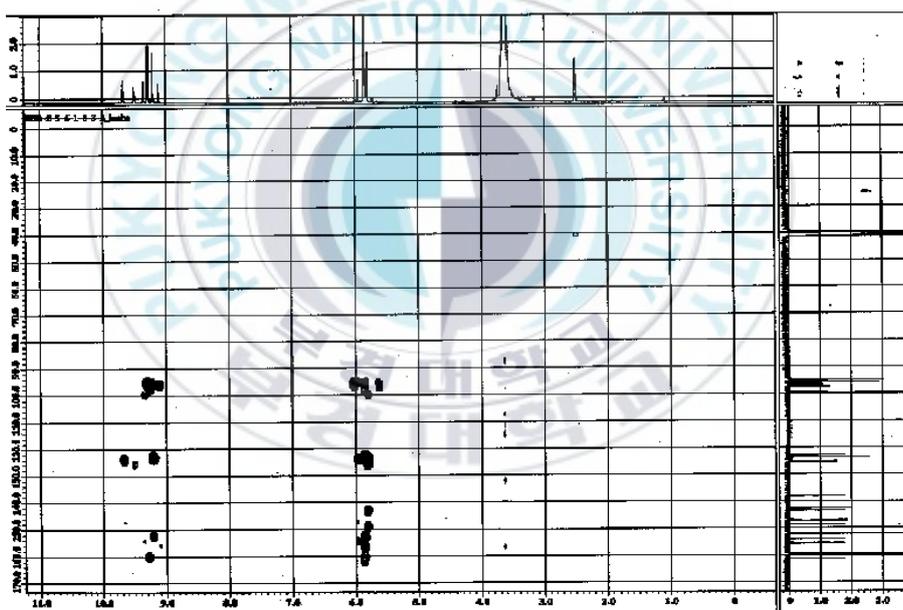


Fig. 16. HMBC spectrum of compound **9** in DMSO-*d*₆.

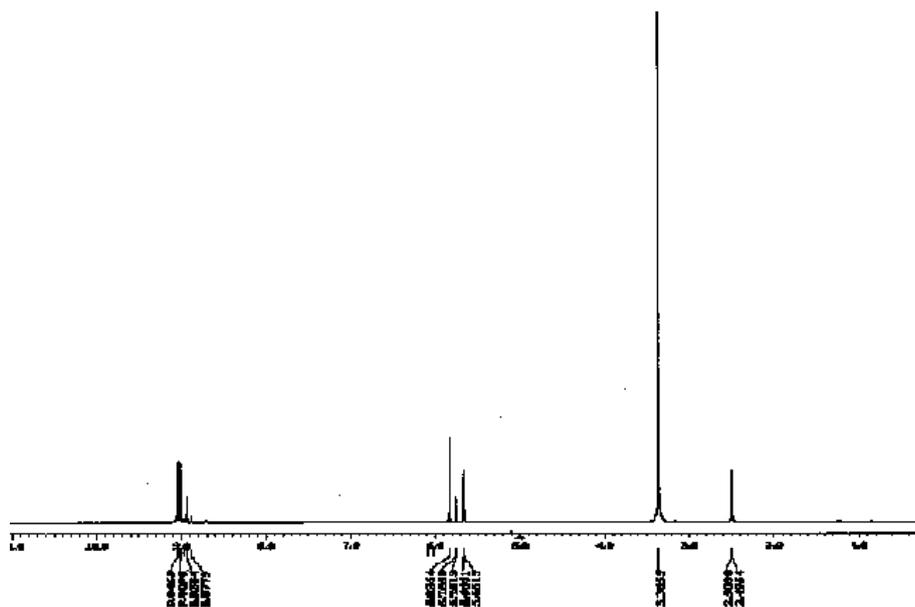


Fig. 19. ^1H -NMR spectrum of compound **11** in $\text{DMSO-}d_6$.

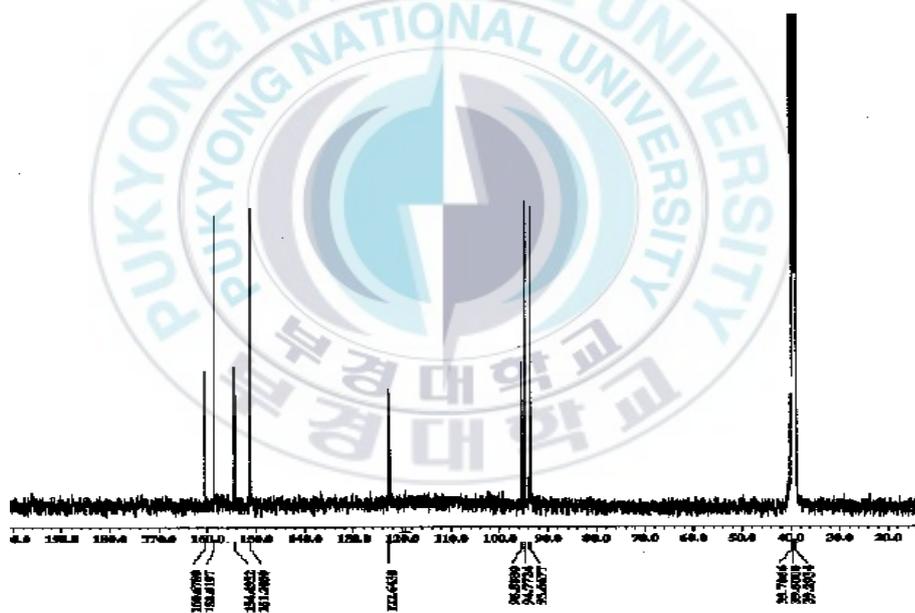


Fig. 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound **11** in $\text{DMSO-}d_6$.

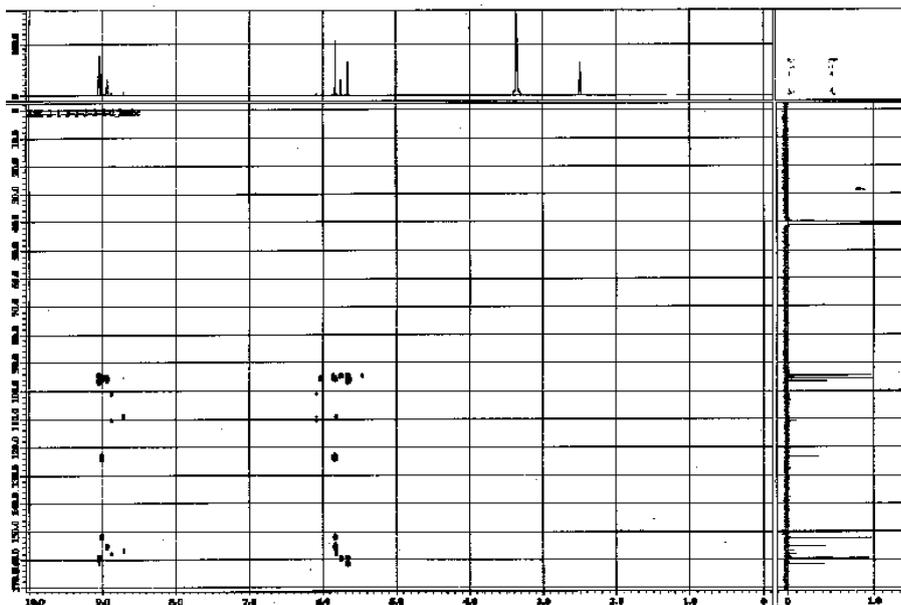
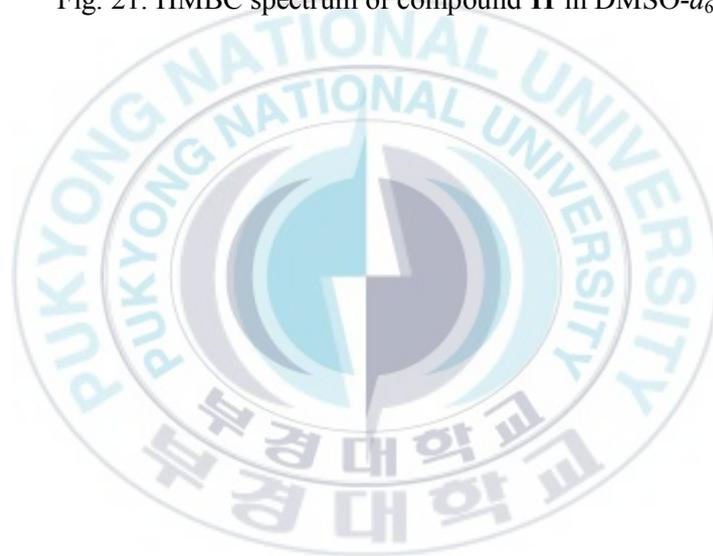


Fig. 21. HMBC spectrum of compound **11** in DMSO- d_6 .



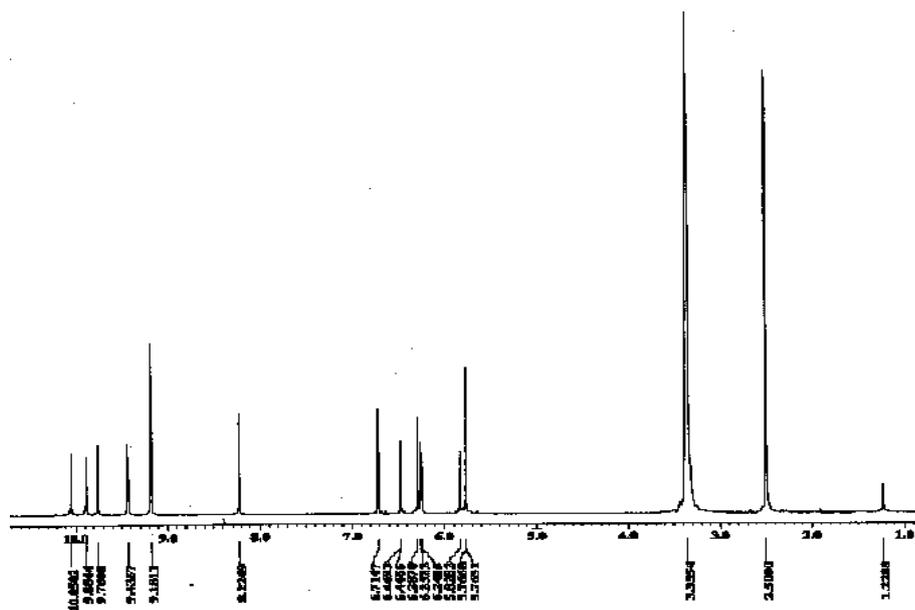


Fig. 22. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$.

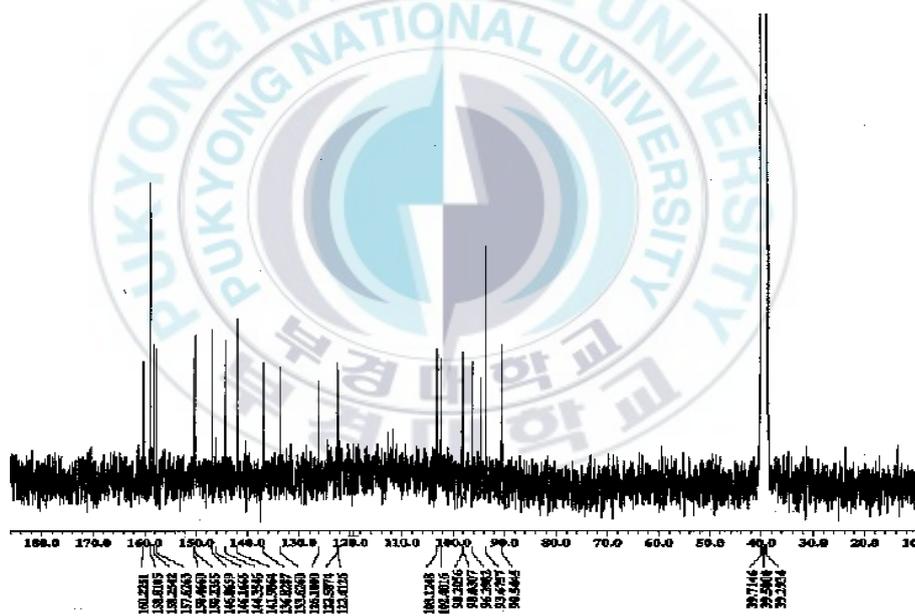


Fig. 23. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$.

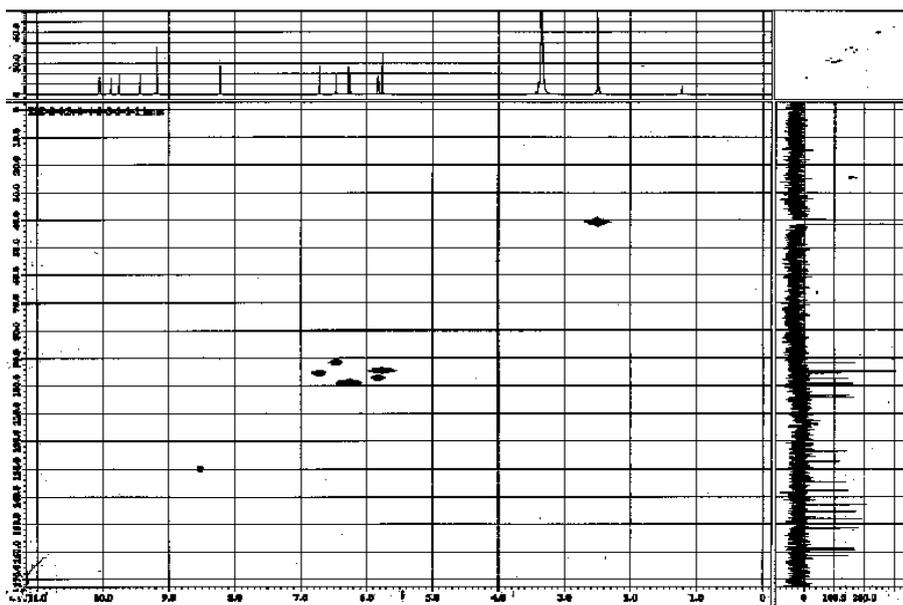


Fig. 24. HMQC spectrum of compound **12** in DMSO- d_6 .

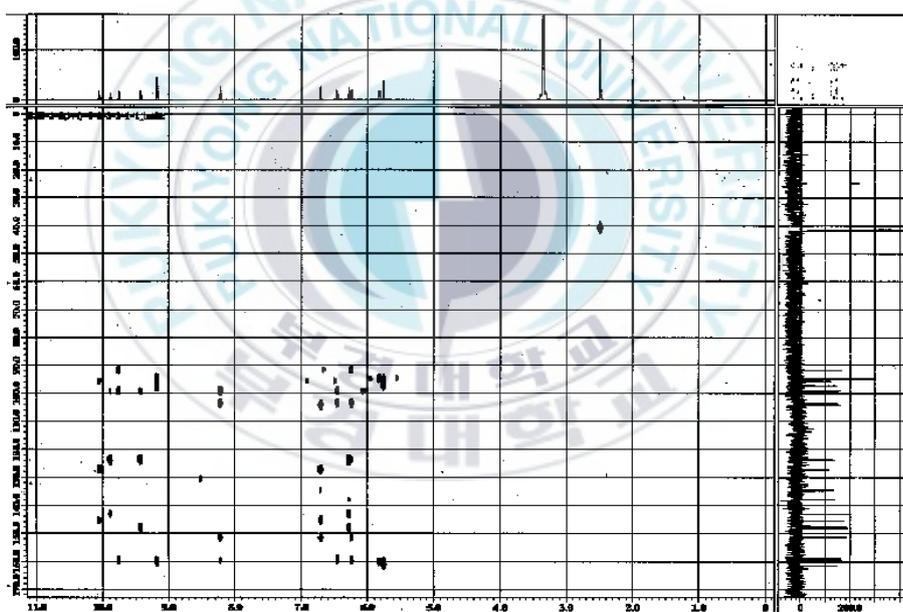


Fig. 25. HMBC spectrum of compound **12** in DMSO- d_6 .

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of compound **12** in DMSO-*d*₆

Position	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
	δ (m, <i>J</i> in Hz)	
2	9.44 (1H, s)	146.9
3	6.29 (1H, s)	98.2
4	9.88 (1H, s)	142.0
4a		122.6
5a		133.6
6		103.1
7		102.4
8	8.22 (1H, s)	150.2
9	6.25 (1H, d, <i>J</i> =1.5 Hz)	98.0
10	9.76 (1H, s)	157.6
11	6.47 (1H, d, <i>J</i> =1.1 Hz)	90.5
11a		158.3
12a		150.5
13	6.71 (1H, s)	94.6
14	10.05 (1H, s)	144.4
14a		126.1
15a		136.8
1'		160.7
2', 6'	5.76 (2H, d, <i>J</i> =1.5 Hz)	93.7
3', 5'	9.18 (2H, s)	158.8
4'	5.83 (1H, s)	96.3

Assignment based on HMQC, HMBC experiments

2. 생리활성 실험

2-1. *in vitro* 실험

2-1-1. 해조류 ethanol 추출물의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성 검색

알츠하이머병, 당뇨병 합병증 그리고 tacrine으로 유도된 간독성으로부터 간 보호에 대한 효과를 채집한 각종 해조류 ethanol 추출물을 이용하여 cholinesterase 억제활성, lens aldose reductase 억제활성, tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 간세포 보호활성을 검색하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

Cholinesterase 억제활성에서 100.0 µg/ml의 농도로 해조류 추출물의 활성을 검색하였으며, 이들 해조류 추출물 중에 *Ecklonia* 종에 속하는 곰피와 감태의 ethanol 추출물은 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase를 각각 $45.95 \pm 3.10\%$ 와 $30.90 \pm 4.20\%$ 그리고 $21.28 \pm 2.21\%$ 와 $13.14 \pm 2.24\%$ 로 cholinesterase 억제활성이 나타났다. 특히, 곰피는 감태보다 더 강력한 cholinesterase 억제활성을 나타내었는데, 이는 이들 해조류의 활성성분의 조성차이 때문에 나타나는 것으로 생각된다. 선행연구에서 비틀대 모자반의 butyrylcholinesterase 억제활성이 보고되었다 (Ryu *et al.*, 2003). 그러나 본 연구에서 *Sargassum* 종인 뜸부기, 팽생이 모자반, 지충이의 ethanol 추출물에 대한 cholinesterase 억제활성을 측정하였지만, 어떠한 효과도 나타나지 않았는데, 이는 종 사이의 성분의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Lens aldose reductase 억제활성은 50.0 µg/ml의 농도에서 해조류 추출물의 활성을 검색하였으며, 이들 해조류 추출물 중에 곰피와 감태는 lens aldose reductase를 57.16%, 52.55%씩 각각 억제하여 유사한 lens aldose reductase 억제활성이 나타났으나, 곰피가 더 높은 억제활성이 나타난 곰피는 검색한

해조류 추출물 중에서 가장 높은 lens aldose reductase 억제활성이 나타났다.

Tacrine으로 유도한 간독성에 대한 간세포 보호활성을 측정하기 위해 해조류의 ethanol 추출물에 대한 간보호 활성을 검색하였다. 검색한 이들 해조류 추출물 중에서 곰피를 제외한 다른 해조류 추출물은 IC₅₀ 값이 300 µg/ml 이상으로 낮은 간보호 활성이 나타났으나, 곰피 추출물은 IC₅₀ 값이 198.1 µg/ml로 검색한 해조류 중 유일하게 간보호 활성을 나타냈다.

그러므로, 해조류 추출물 검색에서 가장 높은 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 그리고 간보호 활성을 나타낸 곰피 ethanol 추출물을 이용하여 이들 생리활성을 나타내는 활성성분을 분리하고자 하였다.



Table 2. *in vitro* activities of ethanolic extract of Korean seaplant

Seaplant	AChE ^a			BChE ^a			RLAR ^b	HP ^c
	Inhibition (%)			Inhibition (%)			Inhibition (%)	EC ₅₀ (µg/ml)
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM		
<i>Capsosiphon fulvescens</i>	-6.23	±	1.63	13.55	±	4.25	48.87	-
<i>Ulva pertusa</i>	-2.35	±	1.49	-16.99	±	1.45	-	>300
<i>Enteromorpha linza</i>	-14.12	±	6.66	-12.93	±	1.11	-	>300
<i>Enteromorpha prolifera</i>	-16.38	±	4.15	-10.91	±	0.86	-	-
<i>Codium fragile</i>	-6.61	±	6.80	-25.23	±	3.09	-	>300
<i>Undaria pinnatifida</i>	-1.80	±	5.47	4.59	±	0.27	-	>300
<i>Pelvetia siliquosa</i>	1.77	±	5.31	22.10	±	0.29	35.43	>300
<i>Sargassum fulvellum</i>	2.75	±	2.53	-10.80	±	0.30	-	>300
<i>Sargassum horneri</i>	-16.12	±	1.38	-23.91	±	0.78	-	>300
<i>Sargassum thunbergii</i>	8.38	±	1.01	-18.69	±	2.12	-	>300
<i>Ishige okamurae</i>	-21.94	±	6.56	-12.63	±	1.50	-	-
<i>Ecklonia cava</i>	21.28	±	2.21	13.14	±	2.24	52.55	-
<i>Ecklonia stolonifera</i>	45.97	±	3.10	30.90	±	4.20	57.16	198.1
<i>Laminaria japonica</i>	-5.51	±	6.99	4.02	±	4.89	-	>300
<i>Hizikia fusiforme</i>	-		-	-		-	24.9	>300
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	-10.12	±	0.62	5.46	±	4.39	-	>300
<i>Callophyllis japonica</i>	-5.91	±	1.98	-13.15	±	1.37	-	-
<i>Chondracanthus tenellus</i>	-18.90	±	1.19	-2.20	±	3.21	15.45	>300
<i>Chondrus ocellatus</i>	7.19	±	4.31	-33.22	±	2.00	-	>300
<i>Chondrus pinnulatus</i>	7.74	±	4.25	-21.46	±	1.91	-	>300
<i>Meristotheca papulosa</i>	-18.78	±	0.71	-17.60	±	2.04	-	-
<i>Gloiopeltis furcata</i>	-6.09	±	3.05	-15.89	±	2.28	-	-
<i>Gelidium amansii</i>	9.94	±	3.09	23.55	±	0.76	-	-
<i>Gracilaria verrucosa</i>	8.35	±	1.44	6.65	±	4.35	-	-
<i>Corallina officinalis</i>	4.23	±	1.77	-16.50	±	1.28	-	-
<i>Chondria crassicaulis</i>	-3.13	±	4.67	-29.30	±	4.17	39.98	>300
<i>Symphyclocladia latiuscula</i>	-2.81	±	1.26	-35.43	±	1.29	-	-
<i>Porphyra tenera</i>	-6.00	±	3.97	15.83	±	2.89	-	>300-
Eserine	55.09	±	1.11	33.47	±	5.55		
Quercetin							82.53	
Silybin ^d								50.0

AChE: acetylcholinesterase, BChE: butyrylcholinesterase, RLAR: rat lens aldose reductase, HP: hepatoprotection

^aCholinesterase were determined at a concentration of 100.0 µg/ml for the ethanol extracts and 0.0064 µg/ml for eserine as a reference compound. ^bLens aldose reductase was determined at a concentration of 50.0 µg/ml for the ethanol extracts and 10 µg/ml for quercetin as a reference compound. ^cHepatoprotective activity was expressed as the mean of 50% effective concentrations of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve. ^dSilybin is used a positive control on hepatoprotective activity.

2-1-2. 곰피의 ethanol 추출물과 각 분획물들의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성

검색한 해조류에서 가장 높은 활성을 나타낸 곰피의 ethanol 추출물과 ethanol 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H₂O 층에 대한 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 간보호 활성을 측정하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

곰피의 ethanol 추출물은 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 억제활성에서 IC₅₀ 값이 108.11 ± 2.35 µg/ml과 161.54 ± 4.20 µg/ml로 나타났다. 곰피의 ethanol 추출물로부터 얻은 분획물의 acetylcholinesterase 억제활성은 EtOAc 분획물 (IC₅₀ = 26.46 ± 4.76 µg/ml) > CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀ = 71.52 ± 5.46 µg/ml) > *n*-BuOH 분획물 (IC₅₀ = 82.15 ± 3.23 µg/ml)의 순으로 나타났으며, 분획물 중에서 EtOAc 분획물이 가장 강력한 acetylcholinesterase 억제활성이 나타났다. 반면에, butyrylcholinesterase 억제활성에서는 *n*-hexane 분획물 (IC₅₀ = 68.40 ± 4.03 µg/ml)과 CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀ = 71.01 ± 3.58 µg/ml)이 강한 활성이 나타났고, EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물은 IC₅₀ 값이 각각 173.50 ± 5.04 µg/ml과 258.80 ± 4.03 µg/ml로 낮은 butyrylcholinesterase 억제활성이 나타났다. 그러나, 분획물들 중에서 H₂O 분획물은 어떠한 cholinesterase 억제활성도 나타나지 않았다. 이들 결과에서 acetylcholinesterase 억제활성에서는 다소 높은 극성을 가진 EtOAc 분획물이 가장 큰 활성이 나타났고, butyrylcholinesterase에서는 비극성의 *n*-hexane 분획물이 가장 큰 억제활성을 나타나는 것으로 보아 EtOAc와 *n*-hexane 분획물의 활성성분이 EtOAc 분획물에 풍부한 phlorotannin 성분과 *n*-hexane 분획물에 풍부한 sterol 성분임을 추측할 수 있었다.

곰피 분획물의 lens aldose reductase 억제활성은 10.0 µg/ml의 농도에서 EtOAc 분획물 (26.63 ± 1.02%) > H₂O 분획물 (20.67 ± 0.55%) > CH₂Cl₂ 분획물 (19.98 ± 0.67%) > *n*-hexane 분획물 (18.49 ± 0.62%) > *n*-BuOH 분획물 (17.98 ± 1.22%)의

순으로 나타났다. 분획물들 중에서 EtOAc 분획물이 가장 강력한 lens aldose reductase 억제활성이 나타났다. 이 결과로부터 당뇨성 합병증의 지표로 알려진 곰피의 lens aldose reductase의 억제효과는 EtOAc 분획물에 풍부한 phlorotannin 성분에 의해서 나타나는 것으로 추측할 수 있었다.

간보호 활성에서는 곰피의 분획물들 중에서 EtOAc 분획물은 EC_{50} 값이 195.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 간보호 활성이 나타났고, EtOAc 분획물을 제외한 나머지 분획물에서는 어떠한 간보호 활성도 나타나지 않았다. 이 결과로부터 tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 간보호 효과는 곰피의 EtOAc 분획물에 풍부한 phlorotannin 성분에 의해서 나타나는 것으로 추측할 수 있었다.

따라서 butyrylcholinesterase 억제활성에서 높은 활성을 나타낸 *n*-hexane 분획물과 acetylcholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 간보호 활성에서 가장 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획물에 이들 활성을 나타내는 활성성분이 존재할 것으로 생각된다.



Table 3. *in vitro* activities of the ethanolic extract and its fractions obtained from the ethanolic extract of *Ecklonia stolonifera*

Samples	AChE	BChE	RLAR ^b	HP ^c
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	Inhibition (%)	EC ₅₀ (µg/ml)
	Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean ± SEM	
Ethanolic extract	108.11 ± 2.35	161.54 ± 4.20	57.16 ± 0.35	198.1
<i>n</i> -Hexane fraction	>300	68.40 ± 4.03	18.49 ± 0.62	>300
CH ₂ Cl ₂ fraction	71.52 ± 5.46	71.10 ± 3.54	19.98 ± 0.67	>300
EtOAc fraction	26.49 ± 4.76	173.50 ± 5.04	26.63 ± 1.02	195.2
<i>n</i> -BuOH fraction	82.51 ± 3.23	258.80 ± 4.03	17.98 ± 1.22	>300
H ₂ O fraction	>300	>300	20.67 ± 0.55	>300
Eserine ^a	0.004 ± 0.001	0.02 ± 0.004		
Quercetin				50.0
Silybin ^d			75.62 ± 0.18	

AChE: acetylcholinesterase, BChE: butyrylcholinesterase, RLAR: rat lens aldose reductase, HP: hepatoprotection
^aEserine is used a positive control on cholinesterase inhibitory activity. ^bLens aldose reductase was determined at a concentration of 10.0 µg/ml for the ethanol extract and its fractions obtained from the ethanolic extract of *E. stolonifera* and 10.0 µg/ml for quercetin as a reference compound. ^cHepatoprotective activity was expressed as the mean of 50% effective concentrations of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve. ^dSilybin is used a positive control on hepatoprotective activity.

2-1-3. 분리된 화합물의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성 및 간보호 활성

Butyrylcholinesterase 억제활성이 가장 높게 나타난 곰피 *n*-hexane 분획물과 acetylcholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 간보호 활성에서 가장 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획물을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20 그리고 RP-18 column chromatography를 수행하여, 이들 활성을 나타내는 성분을 분리, 정제하였다. 곰피의 *n*-hexane 분획물에서 2종의 sterol 화합물 (1 and 2)과 EtOAc 분획물에서 10종의 phlorotannin 화합물 (3-12)을 분리하였으며, 분리된 화합물을 대상으로 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 간보호 활성을 평가하였으며, 그 결과를 Table 4에 나타내었다.

곰피의 분획물들 중 butyrylcholinesterase 억제활성에서 가장 높은 활성을 나타낸 *n*-hexane 분획물과 acetylcholinesterase 억제활성을 나타낸 EtOAc 분획물로부터 반복적인 column chromatography를 수행하여, *n*-hexane 분획물로부터 sterol 성분을 EtOAc 분획물로부터 phlorotannin 성분을 분리하였으며, 이들 화합물의 cholinesterase 억제활성을 측정하였다.

분리된 화합물 중 dioxinodehydroeckol (4), eckol (5), phlorofucofuroeckol-A (6), dieckol (7), 2-phloroeckol (8)과 7-phloroeckol (9)은 IC₅₀ 값이 42.66 ± 8.48, 20.56 ± 5.61, 4.89 ± 2.24, 17.11 ± 3.24, 38.13 ± 4.95와 21.11 ± 4.16 μM로 강력한 acetylcholinesterase 억제활성을 나타내었으며, 24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol (2)은 acetylcholinesterase 억제활성에서 IC₅₀ 값이 389.10 ± 2.29 μM로 낮은 활성이 나타났다. 반면에 fucosterol (1), 24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol (2), dioxinodehydroeckol (4)과 phlorofucofuroeckol-A (6)은 IC₅₀ 값이 421.72 ± 1.43, 176.46 ± 2.51, 230.27 ± 3.52, 136.71 ± 3.32 μM로 다소 낮은 butyrylcholinesterase 억제활성이 나타났다. 그러나, phloroglucinol (3)과 triphlorethol-B (8)는 cholinesterase 억제활성이 나타나지 않았다. Eckol (5), dieckol (7), 2-phloroeckol (8)과 7-phloroeckol (9)은 acetylcholinesterase에 대해 선택적으로 농도 의존적인

억제활성을 나타낸 반면에 dioxinodehydroeckol (4)과 phlorofucofuroeckol-A (6)는 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 모두에서 강한 억제활성이 나타났다. 이들 결과로부터 phloroglucinol과 같은 monomer와 opened-chain trimer인 triphlorethol-B와 같은 구조는 cholinesterase 억제활성을 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그러므로, phlorotannin 구조에서 phloroglucinol의 중합도와 closed-ring의 구조는 cholinesterase 억제활성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

알츠하이머병의 발병 원인 중 하나인 acetylcholinesterase는 기질특이성을 가진 효소로서 신경 스냅스에서 신경전달물질인 acetylcholine을 choline과 acetate로 분해시켜 콜린성 뉴런을 소실시키고, 콜린성 신경전달을 감소시켜 알츠하이머병을 유발한다 (Greig *et al.*, 2001). Acetylcholinesterase와 함께 알츠하이머병의 원인으로 알려진 butyrylcholinesterase는 plasma와 조직에 존재하며, 기질 비특이적 효소로 알려져 있다 (Silman and Sussman, 2005). 이 효소의 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, 노인성 치매 환자의 뇌에서 다량으로 발견되며, 치매를 유발하는 신경성 plaque를 형성하는데 작용하고, 알츠하이머병의 후기에 acetylcholine의 분해를 담당하여 치매의 환자의 행동심리에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Soreq and Seidman, 2001; Mack and Robitzki, 2000; Rakinczay and Brimijoin, 1988). Cholinesterase 억제제는 알츠하이머병 형태의 치매 환자에게 가장 큰 치료효과를 나타내는 약물로서 기억력과 집중력과 같은 인식능력과 행동장애에 효과를 나타낸다고 알려져 있다 (Giacobini, 2004). Acetylcholinesterase 억제제는 알츠하이머병 환자의 뇌에서 acetylcholine의 농도를 증가시켜, 콜린성 신경전달물질을 증가시켜 인식능력을 증가시키고, butyrylcholinesterase 억제제는 치매환자의 뇌에서 증가된 신경성 plaque를 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있어 (Giacobini, 2004; Yu *et al.*, 1999), acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase을 균형적으로 억제하는 것은 알츠하이머병 치료에 있어서 더 큰 효과를 나타낼

수 있다 (Yu *et al.*, 1999). 따라서 곰피와 곰피에서 분리된 phlorotannin 성분은 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase를 동시에 억제함으로써 알츠하이머 병을 효과적으로 예방할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

곰피의 분획물들 중에서 가장 높은 lens aldose reductase 억제활성을 나타낸 EtOAc 분획물로부터 얻은 phlorotannin 화합물에 대한 lens aldose reductase 억제활성에서 triphlorethol-B (8), diphlorethol (11), fucofuroeckol-A (12)를 제외한 나머지 phlorotannin 화합물은 lens aldose reductase 억제활성이 나타났다. dioxinodehydroeckol (4)과 7-phloroeckol (10)은 IC₅₀ 값이 21.95와 27.54 μM로 가장 높은 lens aldose reductase 억제활성이 나타났고, eckol (5)과 dieckol (7)의 IC₅₀ 값이 54.68과 42.49 μM로 그 다음으로 높은 억제활성이 나타났다. 그러나 phlorofucofuroeckol-A (6)과 2-phloroeckol (9)의 IC₅₀ 값이 125.45와 99.62 μM로 다소 낮은 활성이 나타났다.

당뇨병으로 인해 혈중에 고혈당이 지속되면서 나타나는 대표적인 합병증으로 당뇨병 망막증, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증이 있으며, 이들 중 당뇨병 망막증은 미세혈관의 합병증으로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다 (Seaquist *et al.*, 1989). 당뇨병 합병증에서 aldose reductase 작용에 대한 관련성에 관한 근거는 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 고혈당에 의한산화적 스트레스의 증가와 polyol pathway의 이상에 기인하는 것으로 알려져 있다 (Lim *et al.*, 2006). 고혈당이 지속되면 세포내에 유입된 고농도의 glucose에 의해 polyol pathway의 핵심효소인 aldose reductase가 활성화되어 정상 상태의 약 2~4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성되며 (Travis *et al.*, 1974; Malone *et al.*, 1980), 생성된 sorbitol은 축적되는 부위에 따라 발병증상이 나타난다 (Heath and Hamlett, 1976). 그러므로, sorbitol 생성을 억제하는 aldose reductase 억제제가 당뇨병 합병증의 발병을 억제하게 되는 것이다. 선행연구에 따르면, 곰피로부터 분리된 phlorotannin 성분은 강력한 활성산소종 (ROS) 억제활성을 나타내는 것으로 알려져 있다

(Kang *et al.*, 2004a). 이 결과로부터 고혈당으로 활성화되는 aldose reductase를 억제하는 능력은 phlorotannin 성분이 가지고 있는 강력한 항산화력에 의해 나타나는 것으로 보인다.

곰피의 분획물들 중에서 가장 큰 간보호 활성을 나타낸 EtOAc 분획물로부터 분리된 phlorotannin 화합물 중에 dioxinodehydroeckol (4)과 phlorofucofuroeckol-A (6)는 tacrine으로 유도된 인간 간암 세포종인 Hep G2 cell에서의 세포독성에 대한 50% 세포생존을 농도인 EC₅₀ 값이 62.0과 79.2 µg/ml로 강력한 간보호 활성이 나타났다. 특히, dioxinodehydroeckol (4)은 대조 화합물인 silybin (EC₅₀= 50.0 µg/ml)과 비교할 만한 강력한 간보호 효과를 나타냈다.

Tacrine은 약물대사과정에서 세포내의 glutathione 농도를 변화시켜, 세포내에 활성산소종 (ROS)을 생성하고, 그것으로 인해 간세포의 지질 과산화를 유발하여 간세포에 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Osseni *et al.*, 1999). 이것은 항산화 효과를 가지는 화합물이 tacrine으로 유발된 간세포 독성으로부터 간세포를 보호할 수 있음을 의미한다. Kang 등은 (2004) 곰피로부터 분리된 phlorotannin 화합물의 ROS 생성을 억제한다고 보고하였다 (Kang *et al.*, 2004a). 이는 phlorotannin 화합물이 강력하게 ROS 생성을 억제하여 tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 간세포 보호효과에 중요하게 작용하는 것으로 보인다.

이러한 결과로부터 phlorotannin 성분이 알츠하이머병, 당뇨병 합병증, 간독성을 예방하고 치료할 수 있는 기능성 식품 소재로서의 가능성이 있음을 제시하였다.

Table 4. *in vitro* activities of compounds isolated from *Ecklonia stolonifera*

Compounds	AChE	BChE	RLAR	HP ^d
	IC ₅₀ (μM) Mean ± SEM	IC ₅₀ (μM) Mean ± SEM	IC ₅₀ (μM) Mean ± SEM	EC ₅₀ (μg/ml)
1	>500	421.72 ± 1.43	- ^e	- ^e
2	389.1 ± 2.29	176.46 ± 2.51	- ^e	- ^e
3	>500	>500	72.54 ± 0.36	>100
4	42.66 ± 8.48	230.27 ± 3.52	21.95 ± 1.40	62.5
5	20.56 ± 5.61	>500	54.68 ± 0.99	>100
6	4.89 ± 2.28	136.71 ± 3.33	125.45 ± 1.09	79.2
7	17.11 ± 3.24	>500	42.39 ± 1.99	>100
8	>500	>500	>300	- ^e
9	38.13 ± 4.95	>500	99.62 ± 2.27	- ^e
10	21.11 ± 4.16	>500	8.51 ± 1.99	- ^e
11	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e
12	- ^e	- ^e	- ^e	- ^e
Eserine ^a	0.02 ± 0.002	0.06 ± 0.02		
Tacrine ^a	0.06 ± 0.004	0.001 ± 0.0001		
Berberine ^a	0.06 ± 0.001	1.29 ± 0.007		
Quercetin ^b			2.54 ± 1.99	
Silybin ^c				50.0

AChE: acetylcholinesterase, BChE: butyrylcholinesterase, HP: hepatoprotection, RLAR: lens aldose reductase

^aEserine, tacrine and berberine were used a positive control on cholinesterase inhibitory activity. ^bQuercetin was used as a reference compound on lens aldose reductase inhibitory activity. ^cSilybin was used a positive control on hepatoprotective activity. ^dHepatoprotective activity was expressed as the mean of 50% effective concentrations of triplicate determinations, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve. ^eNo detected compounds.

2-2. *in vivo* 실험

2-2-1. 곰피의 추출물 및 극성 분획물의 고지혈증 억제활성

본 연구에서는 흰쥐에게 poloxamer 407을 투여하여 고지혈증 동물모델을 만들었으며, 고지혈증이 유발된 흰쥐를 이용하여 곰피의 ethanol 추출물 및 phlorotannin 화합물이 함유되어 있는 다소 극성이 높은 분획물들 즉, EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물과 H₂O 분획물을 투여하여 저지혈증 효과를 측정하였으며, 그 결과를 Table 5에 나타내었다.

Poloxamer 407을 복강투여한 고지혈증 유발군을 정상군과 비교하였을 때, 중성지질, 총 콜레스테롤, low density lipoprotein (LDL) 콜레스테롤 수치가 현저하게 증가하였으며, 동맥경화지수인 A.I. 값도 유의적으로 증가하여, 고지혈증이 유발되었음을 확인하였다. 고지혈증이 유발된 실험동물에 체중 kg당 125와 250 mg의 곰피 ethanol 추출물을 1일 1회, 3일간 경구투여 하였다. 그 결과, 총 콜레스테롤 수치는 15.6%와 20.0%, LDL 콜레스테롤 수치는 26.2%와 34.6% 감소하였으며, 동맥경화지수는 26.1%와 39.1% 감소하였다. 이들 결과로부터 곰피 ethanol 추출물은 poloxamer 407로 유발된 고지혈증이 유발된 흰쥐에서 저지혈증 효과가 나타났다. 곰피의 저지혈증 효과를 좀 더 구체적으로 확인하기 위해서 phlorotannin 화합물이 풍부한 곰피의 극성 분획물을 이용하여 고지혈증 억제활성을 측정하였다. Poloxamer 407로 고지혈증이 유발된 흰쥐에 EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물과 H₂O 분획물을 체중 kg당 100 mg을 각각 경구투여하였다. 그 결과, EtOAc 분획물 투여군과 *n*-BuOH 분획물 투여군에서 고지혈증 유발군과 비교하였을 때, 총 콜레스테롤 수치가 24.2%와 24.3%, 중성지질 수치가 21.1%와 22.6%, LDL 콜레스테롤 수치가 43.0%와 40.9%로 유의적으로 감소하였고, high density lipoprotein (HDL) 콜레스테롤 수치는 39.9%와 31.1%로 유의적인 증가를 보였다. 이들 결과로부터 얻어진 동맥경화지수는 고지혈증 유발군과 비교하여 각각

52.2%와 50.0% 감소하였다. 이들 결과에서 EtOAc 분획물 투여군은 *n*-BuOH 분획물 투여군과 거의 유사한 결과를 보였지만, 좀 더 강한 고지혈증 억제활성이 나타났다. 그러나 H₂O 분획물은 어떠한 저지혈증 효과도 나타내지 않았다.

이들 결과로부터 곰피의 강력한 저지혈증 효과는 2차 대사산물인 phlorotannin 성분에 의해서 나타나는 것으로 추측할 수 있었다.



Table 5. Effect of the EtOH extract and its polar fractions on serum levels in poloxamer 407 induced hyperlipidemic rats^a

Treatments	Dose (mg/kg bw)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	A.I.
Control		275.9 ± 10.1 (100.0)	293.1 ± 15.3 (100.0)	48.9 ± 2.9 (100.0)	168.3 ± 12.8 (100.0)	4.6 ± 0.5 (100.0)
EtOH extract	125	232.8 ± 11.8 ^b (84.4)	261.4 ± 17.8 (89.2)	52.0 ± 1.9 (106.3)	124.2 ± 8.0 ^c (73.8)	3.4 ± 0.2 ^c (73.9)
	250	220.7 ± 10.5 ^c (80.0)	259.7 ± 10.4 (88.6)	58.7 ± 4.5 (120.0)	110.0 ± 7.1 ^d (65.4)	2.8 ± 0.2 ^d (60.9)
EtOAc fraction	100	209.0 ± 5.7 ^d (75.8)	231.3 ± 10.7 ^b (78.9)	68.4 ± 3.4 ^d (139.9)	96.0 ± 5.1 ^d (57.0)	2.2 ± 0.1 ^d (47.8)
<i>n</i> -BuOH fraction	100	208.9 ± 14.2 ^d (75.7)	226.8 ± 18.9 ^b (77.4)	64.1 ± 2.3 ^c (131.1)	99.5 ± 10.3 ^d (59.1)	2.3 ± 0.2 ^d (50.0)
H ₂ O fraction	100	248.8 ± 7.5 (90.2)	291.1 ± 12.9 (99.3)	49.3 ± 4.3 (100.9)	143.5 ± 5.7 ^b (85.3)	4.3 ± 0.5 (93.5)
Lovastatin	50	183.9 ± 13.1 ^d (66.7)	193.0 ± 17.0 ^d (65.8)	72.3 ± 4.2 ^d (147.9)	70.3 ± 9.5 ^d (41.8)	1.5 ± 0.1 ^d (21.7)

^aTC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol, A.I.: atherogenic index.

Values are mean ± S.E.M. for seven rats. Figures in parentheses are percentage of the control value. ^b*p* < 0.05, ^c*p* < 0.01, ^d*p* < 0.001 vs. control group.

2-2-2. 곰피로 분리된 화합물의 고지혈증 억제활성

Poloxamer 407로 고지혈증이 유발된 흰쥐에서 가장 높은 저지혈증 활성을 나타낸 EtOAc 분획물로부터 다량 분리된 곰피의 주성분인 eckol (5)과 dieckol (7)을 poloxamer 407로 유발된 고지혈증 흰쥐에 경구투여하여 고지혈증 억제활성을 측정하였으며, 그 결과를 Table 6에 나타내었다.

Poloxamer 407로 고지혈증이 유발된 유발군은 혈청 중성지질, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 수치와 동맥경화지수가 현저하게 증가하였다. 고지혈증이 유발된 흰쥐에 eckol (5)과 dieckol (7)을 체중 kg 당 10 mg과 20 mg씩 각각 1일 1회, 3일간 경구투여하였다. Eckol 10 mg을 투여한 군에서 혈청 총 콜레스테롤 (16.8%)과 LDL 콜레스테롤 (34.6%) 수치와 동맥경화지수 (36.6%)가 유의적으로 감소하였고, 20 mg을 투여한 군에서는 혈청 중성지질 (27.2%), 총 콜레스테롤 (38.6%), LDL 콜레스테롤 (56.6%) 수치와 동맥경화지수 (49.0%)가 농도 의존적으로 유의적인 감소가 나타났다. Dieckol을 10 mg과 20 mg을 투여한 군에서는 혈청 중성지질 (15.5%와 31.0%), 총 콜레스테롤 (25.5%와 43.4%), LDL 콜레스테롤 (51.0%와 75.5%) 수치와, 동맥경화지수 (58.2%와 72.6%)가 농도 의존적으로 유의적인 감소가 나타났으며, 뿐만 아니라 혈청 HDL 콜레스테롤 (31.1%와 35.4%) 수치가 현저하게 증가하였다. 이들 결과는 eckol (5)과 dieckol (7)이 poloxamer 407로 유발된 고지혈증 실험동물 모델에서 혈청 지질 성분의 조절에 의해서 고지혈증 억제효과가 있음이 나타났으며, 또한, 고지혈증 치료제로 알려진 HMG-CoA reductase 억제제인 lovastatin을 체중 kg 당 25 mg과 50 mg을 경구투여한 동물군과 비교할만한 효과가 나타남으로써 곰피에서 분리된 phlorotannin 성분이 합성 statin계 약물을 대체할 수 있는 강한 고지혈증 억제효과를 나타내는 약물로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이에 콜레스테롤 조절에서 더 유용한 효능을 가지는 고지혈증 치료제를 평가하기 위한 방법으로 실험동물에 고콜레스테롤 식이를 이용하여 고콜레스테롤혈증을 유발하여 그 효과를 측정하였다 (Yokozawa *et al.*, 2002).

곰피에 다량 함유된 eckol (5)과 dieckol (7)을 고콜레스테롤 식이로 유발된 고콜레스테롤혈증 동물모델을 이용하여 고콜레스테롤 억제효과를 측정하였고, 그 결과를 Table 7에 나타내었다.

고콜레스테롤혈증을 유발하기 위해서 Ro 등 (1994)의 방법을 이용하여 고콜레스테롤 식이를 만들어 흰쥐에게 일주일간 먹인 후, 미정맥 채혈하여 총 콜레스테롤 수치를 확인하여 고콜레스테롤혈증 유발 여부를 확인하였다. 고콜레스테롤 식이를 먹인 고콜레스테롤혈증 유발군은 정상식이를 먹인 정상군과 비교하여 중성지질, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 수치와 동맥경화지수가 현저하게 증가하였고, HDL 콜레스테롤 수치는 급격하게 감소하였다. 고콜레스테롤혈증 유발군에 체중 kg 당 20 mg의 eckol과 dieckol을 각각 1일 1회, 3일간 경구투여하였다. Dieckol을 투여한 동물군에서는 혈청 중성지질 (18.9%), 총 콜레스테롤 (16.4%), LDL 콜레스테롤 (21.9%) 수치와 동맥경화지수 (26.8%)가 유의적으로 감소했지만, HDL 콜레스테롤 수치는 유의적으로 증가되지 않았다. 그러나 eckol을 투여한 실험군에서는 혈청 지질성분에 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 대조군으로 사용한 lovastatin은 poloxamer 407로 유발된 고지혈증 실험동물 모델에서는 유의적인 효과가 나타났으나, 고콜레스테롤 식이로부터 유발된 고콜레스테롤혈증 유발군에서는 유의적인 효과를 나타나지 않았다.

이러한 결과로부터 dieckol은 고지혈증과 고콜레스테롤혈증 모델 흰쥐에서 혈청 지질성분의 조절에서 eckol 보다 훨씬 더 강력한 저지혈증 효과를 나타내는 것으로 보아 phlorotannin 화합물에서 중합도가 큰 화합물이 더 강한 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증 억제활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

이와 같은 dieckol의 강한 고지혈증 억제효과는 dieckol이 가지고 있는 강력한 항산화력과 그로 인한 LDL 콜레스테롤 과산화를 억제하는 효과 있기 때문에 나타나는 것으로 사료된다 (Kang *et al.*, 2003a; 2003b; 2004a; Jung *et al.*, 2006).

고지혈증과 고콜레스테롤혈증은 관상동맥 질환과 아테롬성동맥경화증을 발병시키는 위험인자로 잘 알려져 있다. 고지혈증과 고콜레스테롤혈증으로 증가된 혈중 지질성분의 농도를 저하시키는 것은 아테롬성동맥경화증과 그와 관련된 심장질환의 예방과 치료에 도움이 될 수 있다고 알려져 있다 (McKenney, 2001).

해조류에 대한 저지혈증 효과는 *Caulerpa racemosa*, *Colpomenia sinuosa*, *Iyengarisa stellata*, *Solieria robusta*, *Spatoglossum asperum* (Ara et al., 2002), 툯 (*Hisikia fusiforme*) [Amano et al., 2005], 과래 (*Enteromorpha linza*), 홀과래 (*Monostroma nitidum*) [Ren et al., 1994]와 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*) [Lee et al., 2006]의 추출물에서 알려져 있으며, 해조류의 대표적인 활성성분으로 carrageenan, agar, laminarian (Kim et al., 2006b), alginate (Kimura et al., 1996), fucoidan, glucuronoxylorhamnan (Wang and Yang, 1997) 등과 같은 polysaccharides 성분이 알려져 있다. 이들 성분은 지질대사에 직접적으로 관여하는 것이 아니라 단지 장에서 지질성분의 흡수를 억제하여 저지혈증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Michanek, 1979). 그러나 곰피에서 분리된 phlorotannin 성분은 lipoprotein 대사과정에 작용하여 아테롬성동맥경화증의 위험인자인 LDL 콜레스테롤을 저하시키고, 고지혈증에 의해 혈관에서 생성되는 활성산소종 (ROS)과 ONOO⁻ 생성을 억제함으로써 LDL 콜레스테롤의 과산화를 억제하여 아테롬성동맥경화증을 예방할 수 있다고 사료된다.

Table 6. Effect of eckol and dieckol isolated from *Ecklonia stolonifera* on serum levels in poloxamer 407 induced hyperlipidemic rats^a

Treatments	Dose (mg/kg bw)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	A.I.
Normal		88.9 ± 10.0	77.5 ± 4.1	46.0 ± 7.9	30.5 ± 5.7	0.93 ± 0.2
Hyperlipidemic rats						
Control		255.6 ± 8.7 ^f (100.0)	240.2 ± 14.0 ^f (100.0)	59.9 ± 5.6 (100.0)	145.1 ± 10.4 (100.0)	3.47 ± 0.4 ^f (100.0)
Eckol	10	212.7 ± 14.4 ^{b,f} (83.2)	213.3 ± 17.9 ^f (88.8)	58.9 ± 4.5 (98.3)	94.9 ± 17.9 ^{c,f} (65.4)	2.20 ± 0.4 ^{c,f} (63.4)
	20	157.0 ± 9.7 ^{c,f} (61.4)	174.9 ± 14.6 ^{c,f} (72.8)	66.2 ± 5.2 ^{b,e} (110.5)	63.1 ± 10.1 ^d (43.5)	1.77 ± 0.3 ^d (51.0)
Dieckol	10	190.4 ± 10.8 ^{c,f} (74.5)	203.0 ± 9.7 ^f (84.5)	78.7 ± 3.4 ^{d,f} (131.4)	71.1 ± 9.6 ^{d,e} (49.0)	1.45 ± 0.2 ^d (41.8)
	20	144.7 ± 8.9 ^{c,f} (56.6)	165.7 ± 10.7 ^{c,f} (69.0)	81.4 ± 4.7 ^{d,f} (135.4)	35.5 ± 9.7 ^d (24.5)	0.95 ± 0.2 ^d (27.4)
Lovastatin	25	216.5 ± 17.4 ^{b,f} (84.7)	221.5 ± 18.2 ^f (92.2)	70.1 ± 5.9 ^{c,f} (117.0)	101.2 ± 10.0 ^{b,f} (69.7)	2.18 ± 0.2 ^{c,f} (62.8)
	50	155.3 ± 14.1 ^{c,f} (60.8)	170.1 ± 15.8 ^{c,f} (70.8)	77.5 ± 8.7 ^{d,f} (129.4)	49.0 ± 17.7 ^d (33.8)	1.14 ± 0.3 ^d (32.9)

^aTC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol, A.I.: atherogenic index. Values are mean±S.E.M. for seven rats. Figures in parentheses are percentage of the control value. ^b*p* < 0.05, ^c*p* < 0.01, ^d*p* < 0.001 vs. control group. ^e*p* < 0.05, ^f*p* < 0.01 vs. normal group.

Table 7. Effect of dieckol isolated from *E. stolonifera* on serum levels in rats fed a high cholesterol diet^a

Treatments	Dose (mg/kg bw)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	A.I.
Normal		110.0 ± 4.5	118.4 ± 6.9	49.6 ± 4.3	37.0 ± 15.1	1.31 ± 0.2
Hyperlipidemic rats						
Control		239.9 ± 13.2 ^e (100.0)	271.1 ± 14.3 ^e (100.0)	25.1 ± 3.0 ^d (100.0)	160.6 ± 12.1 ^e (100.0)	7.55 ± 0.7 ^e (100.0)
Eckol	20	226.3 ± 13.9 ^e (94.3)	256.7 ± 7.1 ^e (94.7)	25.6 ± 3.7 ^d (102.2)	146.8 ± 14.8 ^e (97.7)	7.14 ± 1.1 ^e (94.6)
Dieckol	20	200.7 ± 5.9 ^{b,e} (83.6)	219.8 ± 5.5 ^{c,e} (81.1)	30.2 ± 2.4 ^d (120.3)	125.4 ± 5.3 ^{b,e} (78.1)	5.53 ± 0.4 ^{b,e} (73.2)
Lovastatin	25	237.2 ± 20.0 ^e (97.6)	242.9 ± 14.8 ^e (89.6)	25.2 ± 4.1 ^d (100.4)	157.3 ± 21.4 ^e (97.9)	7.03 ± 1.3 ^e (93.1)
	50	227.9 ± 10.4 ^e (95.0)	225.8 ± 6.5 ^{c,e} (83.3)	29.1 ± 2.8 ^d (115.9)	151.8 ± 12.3 ^e (94.5)	6.76 ± 0.9 ^e (89.5)

^aTC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol, A.I.: atherogenic index. Values are mean ± S.E.M. for seven rats. Figures in parentheses are percentage of the control value. ^b*p* < 0.05, ^c*p* < 0.01 vs. control group. ^d*p* < 0.01, ^e*p* < 0.001 vs. normal group.

IV. 요약 및 결론

곰피는 다시마과의 다년생 갈조류로서 한국의 동부와 남부해안에 분포하며, 다시마와 미역과 함께 식용으로 이용된다. 곰피는 항산화, 항돌연변이 활성과 섭식저해 효과를 나타내며, 이러한 유용한 효과는 phlorotannin 성분에 의한 것으로 알려져 있다. Phlorotannin 성분은 갈조류의 페놀성 2 차 대사산물로 phloroglucinol (1,3,5-trihydrobenzene)의 중합체로 구성되어 있으며, *Ecklonia* 종과 *Eisenia* 종의 생리활성 성분으로 다양한 생리활성이 알려져 있다. 수종의 해조류 추출물 중 *in vitro* 실험에서 가장 효과가 뛰어난 곰피로부터 phlorotannin 성분을 분리하였고, 분리된 phlorotannin 성분에 대한 알츠하이머병, 당뇨병 합병증, tacrine 으로 유도된 간세포 독성 그리고 고지혈증에 대한 억제효과를 cholinesterase 와 lens aldose reductase 억제활성법, 간보호 활성법 그리고 고지혈증 억제활성법을 *in vitro* 와 *in vivo* 실험을 수행하여 이들 성분의 생리활성을 검색하였다.

1. 우리나라에 자생하는 해조류의 에탄올 추출물의 cholinesterase (acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase)와 lens aldose reductase 억제활성 및 Hep G2 cell에서 타크린으로 유도된 간세포 독성에 대한 간보호 효과를 *in vitro* 실험을 통하여 검색하였다. 검색한 해조류 중 곰피는 cholinesterase와 lens aldose reductase에 대한 강한 억제활성 뿐만 아니라 강력한 간보호 활성이 나타났다. 곰피 에탄올 추출물로부터 얻어진 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H₂O층의 다섯 개의 분획물 중 EtOAc 분획물은 강한 acetylcholinesterase 및 lens aldose reductase 억제활성과 강력한 간보호 활성이 나타났으며, *n*-hexane 분획물은 강한 butyrylcholinesterase 억제활성이 나타났다.

2. Bioassay-guided 분리법에 따라 활성을 나타낸 *n*-hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 column chromatography를 이용하여 12개의 화합물 (**1-12**)을 분리하였다. *n*-Hexane 분획물에서 분리된 두 개의 sterols [fucosterol (**1**) and 24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol (**2**)]과 EtOAc 분획물에서 분리된 10개의 phlorotannins [phloroglucinol (**3**), dioxinodehydroeckol (**4**), eckol (**5**), phlorofucofuroeckol-A (**6**), dieckol (**7**), triphlorethol-B (**8**), 2-phloroeckol (**9**), 7-phloroeckol (**10**), diphlorethol (**11**), fucofuroeckol-A (**12**)]은 문헌치와 직접적인 비교를 통해 구조를 동정하였다. 분리된 화합물 중 화합물 **8-11**은 곰피에서는 처음으로 분리된 화합물이며, 화합물 **12**는 이전에 *Eisenia arborea*에서 acetylation에 의한 hepta-acetate의 형태로 분리되었으나, free형은 천연에서는 처음으로 분리되었다. 이들 화합물의 구조는 1D (¹H, ¹³C, DEPT)와 2D NMR (HMQC, HMBC)의 분광학적 data를 측정하여 문헌치와 비교하여 결정하였다.
3. 곰피로부터 분리된 12개 화합물의 cholinesterase와 lens aldose reductase 억제활성과 타크린으로 유도된 간세포독성에 대한 보호효과를 측정하였다. 분리된 화합물 중 화합물 **4-7, 9**와 **10**은 IC₅₀ 값이 각각 42.66 ± 8.48, 20.56 ± 5.61, 4.89 ± 2.28, 17.11 ± 3.24, 38.13 ± 4.95, 21.11 ± 4.16 μM로 강력한 acetylcholinesterase 억제활성이 나타났으나, 화합물 **2**는 IC₅₀ 값이 389.10 ± 2.29 μM로 낮은 억제활성이 나타났으며, 화합물 **1, 2, 4**와 **6**은 IC₅₀ 값이 각각 421.72 ± 1.43, 176.46 ± 2.51, 230.27 ± 3.52, 136.71 ± 3.32 μM로 다소 낮은 butyrylcholinesterase 억제활성이 나타났다. 그러나 화합물 **3**과 **8**은 acetylcholinesterase 혹은 butyrylcholinesterase에서 어떠한 억제효과도 나타나지 않았다. 이들 결과로부터 cholinesterase 억제활성에서 phlorotannin의 중합도와 closed-ring 구조는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.
4. Lens aldose reductase 억제활성에서 화합물 **8, 11**과 **12**를 제외한 나머지

phlorotannin 화합물은 lens aldose reductase 억제활성이 나타났다. 화합물 4와 10은 IC₅₀ 값이 21.95과 8.51 μM로 가장 강력한 lens aldose reductase 억제활성이 나타났고, 화합물 5와 7은 IC₅₀ 값이 54.68과 42.39 μM로 그 다음으로 높은 억제활성이 나타났으며, 화합물 6은 IC₅₀ 값이 125.45 μM로 다소 낮은 억제활성이 나타났다.

5. 분리된 화합물 중 화합물 4와 6은 인간 간에서 유래한 Hep G2 cell에서 타크린으로 유도된 간세포 독성에서 EC₅₀ 값이 62.0과 79.2 μg/ml로 간보호 활성이 나타났다. 화합물 4는 대조 화합물인 silybin (EC₅₀ = 50.0 μg/ml)과 비교할만한 높은 활성이 나타났으나, 화합물 3, 5와 7은 어떠한 간보호 효과도 나타나지 않았다.
6. 곰피와 곰피에서 분리된 주요 phlorotannin 성분의 저지혈증 효과는 poloxamer 407로 고지혈증이 유발된 흰쥐와 고콜레스테롤 식이를 먹인 고콜레스테롤혈증 흰쥐를 이용하여 연구하였다. 친수성의 무독성 계면활성제인 poloxamer 407로 고지혈증이 유발된 흰쥐의 혈청에서 중성지질, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화지수가 유의적으로 증가되었으나, 곰피의 에탄올 추출물과 phlorotannin 성분이 풍부한 곰피의 EtOAc 분획물과 *n*-BuOH 분획물을 경구투여한 결과, 이들의 혈청 지질 성분이 유의적으로 감소하였다. 혈청 HDL 콜레스테롤은 poloxamer 407로 유발된 고지혈증 흰쥐에서 감소하였으나, EtOAc 분획물 투여군과 *n*-BuOH 분획물 투여군은 혈청 HDL 콜레스테롤 수치가 유의적으로 증가하였다. 특히, EtOAc 분획물 투여군은 *n*-BuOH 분획물 투여군 보다 더 강력한 저지혈증 효과가 나타났다.
7. Poloxamer 407로 유발된 고지혈증 흰쥐의 혈청에서 증가된 총 콜레스테롤, 중성지질, LDL 콜레스테롤 수치와 동맥경화지수는 eckol (5)과 dieckol

(7)을 경구투여한 후에 유의적으로 감소되었으며, HDL 콜레스테롤은 유의적으로 증가하였다. 콜레스테롤 식이를 먹인 고콜레스테롤혈증 흰쥐의 혈청에서 총 콜레스테롤, 중성지질과 LDL 콜레스테롤과 같은 혈청 지질 농도는 증가하였으나, 화합물 7의 경구투여에 의해 이들 지질 성분은 유의적으로 감소하였으며, 동맥경화지수도 감소하였다. 그러나, 화합물 5는 고콜레스테롤혈증 흰쥐에서 어떠한 지질 농도 감소효과도 나타나지 않았다. 이에, 화합물 7은 화합물 5 보다 더 강한 저지혈증 효과가 나타났으며, 그것은 phlorotannin의 중합도가 혈청 지질 농도를 저하시키는 능력에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

이들 결과로부터 곰피와 곰피에서 분리된 phlorotannin 성분이 알츠하이머병, 당뇨병 합병증, 간보호 뿐만 아니라 고지혈증을 치료하고 예방할 수 있는 가능성을 가진 기능성 식품 소재로서 가치가 있다는 것을 증명하고자 하였다.



V. 참고문헌

- 김응진, 민헌기, 최영길 외., 당뇨병학, 고려의학, 1998.
- 유태종, 식품동의보감, 아카데미북, 2000.
- 이규태, 한국인의 음식이야기, 기린원, 1994.
- 전남전략산업기획단, 전남 해양생물 첨단산업화 및 육성계획안, 2004.
- 한복려, 밥, 뿌리깊은 나무, 1991.
- Abuja, P. M. and Albertini, R., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica. Chemica. Acta.*, 306, 1-17, 2001.
- Adhvaryu, M. R., Reddy, N. and Parabia, M. H., Effects of four Indian medicinal herbs on isoniazid-, rifampicin- and pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. *World J. Gastroenterol.*, 13, 3199-3205, 2007.
- Ahmad, I., Anis, I., Malik, A., Nawaz, S. A. and Choudhary, M. I., A new coumarin from *Murraya paniculata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 412-414, 2003.
- Ahmed, E., Nawaz, S. A., Malik, A. and Choudhary, I., Isolation and cholinesterase inhibition studies of sterol from *Haloxylon recuvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 573-580, 2006.
- Ahn, M. J., Yoon, K. D., Kim, C. Y., Kim, J. H., Shin, C. G. and Kim, J., Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown alga, *Ishige okamurae*. *Phytother. Res.*, 20, 711-713, 2006.
- Ahn, M. J., Yoon, K. D., Min, S. Y., Lee, J. S., Kim, J. H., Kim, T. G., Kim, S. H., Kim, N. K., Huh, H. and Kim, J. W., Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlortannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biochemistry*, 35, 9090-9096, 2004a.
- Ahn, M. J., Yoon, K. D., Min, S. Y., Lee, J. S., Kim, J. H., Kim, T. G., Kim, S. H., Kim, N. K., Huh, H. and Kim, J. W., Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannin from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 544-547, 2004b.
- Alzheimer, A., Über eine eijenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr.*, 64,

- 146–148, 1907.
- Amano, H., Kakinuma, M., Coury, D. A., Ohno, H. and Hara, T., Effect of a seaweed mixture on serum lipid level and platelet aggregation in rats. *Fish. Sci.*, 71, 1160-1166, 2005.
- An, R. B., Oh, H. C. and Kim Y. C., Phenolic constituents of galla rhois with hepatoprotective effects on tacrine- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 2155-2157, 2005.
- An, R. B., Sohn, D. H. and Kim, Y. C., Hepatoprotective compounds of the roots of *Cudrania tricuspidata* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 838-840, 2006.
- Ara, J., Sultana, V., Qasim, R. and Ahmad, V. U., Hypolipidemic activity of seaweed from Karachi Coast. *Phytother. Res.*, 16, 479-483, 2002.
- Arnold, T. M. and Targett, N. M., Evidence for metabolic turnover of polyphenolic in tropical brown algae. *J. Chem. Ecol.*, 26, 1393-1410, 2000.
- Arnold, T. M. and Targett, N. M., Quantifying *in situ* rates of phlorotannin synthesis and polymerization in marine brown algae. *J. Chem. Ecol.*, 24, 577-595, 1998.
- Berliner, J. A. and Heinecks, J. W., The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free radical Biol. Med.*, 20, 707, 1996.
- Bodakhe, S. H. and Ram, A., Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku Zasshi*, 127, 1503-1507, 2007.
- Bruehlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P. A. and Testa, B., Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemical Biodiversity*, 1, 819-829, 2004.
- Bu, H. J., Ham, Y. M., Kim, J. M., Lee, S. J., Hyun, J. W. and Lee, N. H., Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannin isolated from *Ecklonia cava*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 37, 92-96, 2006.
- Chapman, V. J. and Chapman, D. J., Sea vegetables (algae as food for man). In *Seaweeds and Their Used*. Chapman and Hall: New York, 62-97, 1980.
- Chen, H., Yan, X., Zhu, P. and Lin, J., Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Journal*, 31, 1-12, 2006.

- Cho, H., Jun, J. Y., Song, E. K., Kang, K. H., Baek, H. Y., Ko, Y. S. and Kim, Y. C., Bakuchiol: a hepatoprotective compound of *Psoralea corylifolia* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Planta Med.*, 67, 750-751, 2001.
- Cho, K. M., Kim, W. G., Lee, C. K. and Yoo, I. D., Terreulactones A, B, C, and D: novel acetylcholinesterase inhibitors produced by *Aspergillus terreus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, 56, 344-350, 2003.
- Cho, K. M., Yoo, I. D. and Kim, W. G., 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-hydroxydihyrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 2317-2320, 2006.
- Choi, J. S., Park, H. J., Jung, H. A., Chung, H. Y., Jung, J. H. and Choi, W. C., A cyclohexanonyl bromophenol from the red alga *Symphycladia latiuscula*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1705-1706, 2000.
- Choi, J. S., Yokozawa, T. and Oura, H., Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus daridiana*. *J. Nat. Prod.*, 1, 218-224, 1991.
- cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats. *J. Parenter Sci.*
- Chounhary, M. I., Yousuf, S., Nawaz, S. A., Ahmed, S. and Rahman, A. U., Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 1358-1361, 2004.
- Chung, H. Y., Choi, H. R., Park, H. J., Choi, J. S. and Choi, W. C., Peroxynitrite scavenging activity of phloroglucinol from *Ecklonia stolonifera*. *Journal of Korean Association of Cancer Prevention*, 5, 1-6, 2000.
- Cláudia, V., Jr. Bolzani, V. S., Pimentel, L. S. B., Castro, N. G., Cabral, R. R., Costa, R. S., Floyd, C., Rocha, M. S., Young, M. C. M., Barreiro, E. J. and Fraga, C. A. M., New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 4184-4190, 2005.
- Cogger, V. C., Warren, A., Fraser, R., Nqu, M., McLean, A. J. and Le Couteur, D. G., Hepatic sinusoidal pseudocapillarization with aging in the non-human primate. *Exp. Gerontol.*, 38, 1101-1107, 2003.
- Colye, J. T., Prince, M. R., DeLong, M. R., Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 44, 1184-1190, 1983.

- Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y. H. and Nelson, S. D., *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine: a cytochrome p-450 mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81, 1327-1331, 1984.
- Decker, M., Novel inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase derived from the alkaloids dehydroevodiamine and rutaecarpine. *Eur. J. Med. Chem.*, 40, 305-313, 2004.
- Donohue, T. M., Curry-McCoy, T. V., Nanji, A. A., Kharbanda, K. K., Osna, N. A., Radio, S. J., Toderò, S. L., White, R. L. and Casey, C. A., Lysosomal leakage and lack of adaptation of hepatoprotective enzyme contribute to enhanced susceptibility to ethanol-induced liver injury in female rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 31, 1-9, 2007.
- Dvornik, D., Simard-Duquesne, N., Krami, M., Sestan, K., Gabbay, K. H., Kinoshita, J. H., Verma, S. D. and Merola, L. O., Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science*, 182, 1146-1148, 1973.
- Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, K. D. V. and Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95, 1961.
- Elwood, J. C., Nash, D. T. and Streeten, D. H., Effect of high-chromium brewer's yeast on human serum lipids. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1, 263-274, 1982.
- Erkelens D. W., Baggen, M. G., Van Doormaal, J. J., Kettner, M., Koningsberger, J. C., Mol, M. J., Clinical experience with simvastatin compared with cholestyramine. *Drugs*, 36, 87-92, 1988.
- Fan, X., Xu, N. J. and Shi, J. G., Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides*. *J. Nat. Prod.*, 66, 455-458, 2003.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Kido, M., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M., Structure of an anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA and inhibitory activities of its derivatives on plasma plasmin inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 349-353, 1989.
- Fukuyama, Y., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Kido, M., Nakayama, Y., Takahashi, M. and Ochi, M., Eckols, novel phlorotannins with a dibenzo-*p*-dioxin skeleton possessing inhibitory effects on α_2 -macroglobulin from brown alga *Ecklonia kurome*

- OKAMURA. *Chem. Lett.*, 739-742, 1985.
- Fukuyama. Y., Kodama. M., Miura. I., Kinzyo. Z., Mori. H., Nakayama. Y. and Takahashi. M., Anti-plasmin inhibitor. VI. Structure of phlorofucofuroeckol-A, a novel phlorotannin with both dibenzo-1,4-dioxin and dibenzofuran elements, from *Ecklonia kurome* Okamura. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 133-135, 1990.
- Gabbay, K. H. and O'Sullivan J. B., The sorbitol pathway. Enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord. *Diabetes*, 17, 239-243, 1968.
- Giacobini, E., Drugs that target cholinesterase. *In cognitive enhancing drugs*; Buccafusco J. J. Ed.; Birkhäuser Verlag: Basel, Boston, Berlin, 11-36, 2004.
- Glombitza, K. W. and Gerstberger, G., Phlorotannin with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. *Phytochemistry*, 24, 543-551, 1985.
- Glombitza, K. W. and Keusgen, M., Fuhalols and deshydroxyfuhalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry*, 38, 987-995, 1995.
- Glombitza, K. W. and Knoss, W., Sulphated phlorotannin from brown alga *Pleurophyucus gardneri*. *Phytochemistry*, 31, 279-281, 1992.
- Glombitza, K. W. and Li, S. M., Hydroxyphloroethols from brown alga *Carpophyllum maschalocarpum*. *Phytochemistry*, 30, 2741-2745, 1991.
- Glombitza, K. W. and Sattler, E., Trifuhalol. ein neuer triphenylather aus *Halidrys siliquosa*. *Tetrahedron lett.*, 43, 4277-4280, 1973.
- Glombitza, K. W. and Schmidt, A., Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*. *Phytochemistry*, 51, 1095-1100, 1999.
- Glombitza, K. W. and Zieprath G., Phlorotannin from the brown alga *Analipus japonicus*. *Planta Med.*, 55, 171-175, 1989.
- Glombitza, K. W., Forster, M. and Eckhardt, G., Polyhydroxyphenylather aus der phaeophyceae *Sargassum muticum*. *Phytochemistry*, 17, 579-580, 1978a.
- Glombitza, K. W. and Gerstberger, G., Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. *Phytochemistry*, 24, 543-551, 1985.
- Glombitza, K. W., Koch, M. and Eckhardt, G., Polyhydroxyphenylather aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry*, 15, 1082-1083, 1976.
- Glombitza, K. W., Rauwald, H. W. and Eckhardt, G., Fucole, polyhydroxyoligophecyle

- aus *Fucus vesiculosus*. *Phytochemistry*, 14, 1403-1405, 1975.
- Glombitza, K. W., Rauwald, H. W. and Eckhardt, G., Phlorotannine aus *Himantalia elongata*. *Phytochemistry*, 16, 1614, 1977.
- Glombitza, K. W., Wegner-Hambloch, S. and Schulten, H. R., Antibiotics from algae, XXXVI. 1, 2 phlorotannin from the brown alga *Cystoseira granulate*. *Planta Med.*, 51, 116-120, 1985.
- Glombitza, K. W., Wiedefeld, G. and Koch, M., 11th IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products. Symposium papers, Vol. 2, Golden Sands, Bulgaria, 1978b.
- Glombitza, K. W., Wiedernfeld, G. and Eckhardt, G., Antibiotics from algae. XX. Low molecular phlorotannin from *Cystoseira baccata*. *Arch. Pharm (Weinheim)*, 311, 393-399, 1978c.
- Grant, M. H., Duthie, S. J., Gray, A. G. and Burke, M. D., Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 4111-4116, 1988.
- Greene, D. A., Lattimer, S. A. and Sima, A. F., Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *New Eng. J. Med.*, 316, 599-606, 1987.
- Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D. K. and Lahiri, D. K., A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.*, 17, 159-165, 2001.
- Hagiwara, H., Wakita, K., Inada, Y. and Hirose, S., Fucosterol decreases angiotensin converting enzyme levels with reduction of glucocorticoid receptors in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139, 348-352, 1986.
- Ham, I., Jung, S. W., Lee, K. J., Park, K. H. and Choi, H. C., Effect of the aerial part of *Artemisa capillaries*, and *A. iwayomogi* on the hyperlipidemia of rats incuded by Triton WR-1339. *Kor. J. Herbology*, 20, 45-52, 2005.
- Han, E. S., Kim, J. W., Eom, M. O., Kang, I. H., Kang, H. J., Choi, J. S., Ha, K. W. and Oh, H. Y., Inhibitory effects of *Ecklonia stolonifera* on gene mutation on mouse lymphoma tk^{+/+} locus in L5178Y-3.7.2C cell and bone marrow micronuclei formation

- in ddY mice. *Environ. Mutagen. Carcinogen.*, 20, 104-111, 2000.
- Hara, I. and Sakurai, T., Isolation and characterization of vanadium bromoperoxidase from marine macroalga, *Ecklonia stolonifera*. *J. Inorg. Biochem.*, 72, 23-28, 1998.
- Hashimoto, M., Kazui, H., Matsumoto, K., Nakano, Y., Yasuda, M. and Mori, E., Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease?, *Am. J. Psychiatry*, 162, 676-682, 2005.
- Hayman, S. and Kinoshita, J. H., Isolation and properties of lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.*, 240, 877-882, 1965.
- Heath, H. and Hamlett, Y. C., The sorbitol pathway: effect of streptozotocin induced diabetes and the feeding of a sucrose-rich diet on glucose, sorbitol and fructose in the retina, blood and liver of rats. *Diabetologia*, 12, 43-46, 1976.
- Honkanen, T., Jormalainen, V., Hemmi, A., Makinen, A. and Heikkila, N., Feeding and growth of the isopod *Idotea baltica* on the brown alga *Fucus vesiculosus*: Roles of inter-population and within-plant variation in plant quality. *Ecoscience*, 9, 332-338, 2002.
- Hoppe H. A. and Lerving, T., *Marine algae in Pharmaceutical Science*. Vol. 2, Walter de Gruyter: Berlin, 3-48, 1982.
- Jaeschke, H., Knight, T. R. and Bajt, M. L., The role of oxidative stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 144, 279-288, 2006.
- Jain, K. S., Kathiravan, M. K., Soman, R. S. and Shishoo, C. J., The biology and chemistry of hyperlipidemia, *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 4674-4699, 2007.
- Janakat, S. and Al-Merie, H., Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 48, 41-44, 2002.
- Joe, M. J., Kim, S. N., Choi, H. Y., Shin, W. S., Park, G. M., Kang, D. W. and Kim, K. Y., The inhibitory effects of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1735-1739, 2006.
- Johnson, T. P. and Palmer, W. K., Mechanism of poloxamer 407-induced hyperlipidemia in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 46, 1037-1042, 1993.

- Johnston, T. P. and Palmer, W. K., Effect of poloxamer 407 on the activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29, 580-585, 1997.
- Jung, H. A., Hyun, S. K., Kim, H. R. and Choi, J. S., Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, 72, 1292-1299, 2006.
- Kang, H. S., Chung, H. Y., Kim, J. Y., Son, B. W., Jung, H. A. and Choi, J. S., Inhibitory phlorotannin from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 194-198, 2004a.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Son, B. W., Nam, T. J. and Choi, J. S., Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 1226-1232, 2004b.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Koh, Y. S., Yoo, B. S., Kim, J. H., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H. and Hyun, J. W., Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage. *Free Radical Research*, 39, 883-892, 2005a.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y. G., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H. and Hyun, J. W., Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, 579, 6295-6304, 2005b.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Park, J. W., Lee, N. H., Na, H. K., Surh, Y. J., You, H. J., Chung, M. H. and Hyun, J. W., Triphloethol-A induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and NF-E2 related factor 2 transcription factor. *FEBS Letters*, 581, 2000-2008, 2007.
- Kang, K. A., Zhang, R., Lee, K. H., Chae, S., Kim, B. J., Kwak, Y. S., Park, J. W., Lee, N. H. and Hyun, J. W., Protective effect of triphlorethol-A from *Ecklonia cava* against ionizing radiation *in vitro*. *J. Radiat. Res (Tokyo)*, 47, 61-68, 2006.
- Kang, H. S., Chung, H. Y., Jung, J. H., Son, B. W. and Choi, J. S., A new phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 1012-1014, 2003a.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H. J., Kim, S. H., Lee, J. G. and Shin, H. C., Antioxidative

- properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 286-293, 2003b.
- Kang, S. Y., Lee, K. Y., Sung, S. H., Park, M. J. and Kim, Y. C., Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 64, 683-685, 2001.
- Kawanishi, K., Ueda, H. and Moriyasu, M., Aldose reductase inhibitors from the nature. *Cur. Med. Chem.*, 10, 1353-1374, 2003.
- Keusgen, M. and Glombitza, K. W., Pseudofuhalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. *Phytochemistry*, 46, 1403-1415, 1997.
- Kim, D. K., Lee, K. T., Baek, N. I., Kim, S. H., Park, H. W., Lim, J. P., Shin, T. Y., Eom, D. O., Yang, J. H. and Eun, J. S., Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 1127-1131, 2004.
- Kim, E. Y., Kim, E. K., Lee, H. S., Sohn, Y. J., Soh, Y. J., Jung, H. S. and Sohn, N. W., Protective effects of *Cuscutae semen* against dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in Sprague-Dawley rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1427-1431, 2007.
- Kim, J. M., Seong, N. S. and Lee, Y. J., The effects of jwa kum-wham and soo ryeon whan on the hyperlipidemia in rats, *Korean J. Herbology*, 20, 91-102, 2001.
- Kim, M. M., Ta, Q. V., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J. and Kim, S. K., Phlorotannin in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sciences*, 79, 1436-1443, 2006a.
- Kim, Y. M., Han, C. K., Bang, S. J. and Park, J. H., Effect of laminaran from *Eisenia bicyclis* on serum lipid in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 841-846, 2006b.
- Kimura, Y., Watanabe, K. and Okuda, H., Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 54, 47-54, 1996.
- Krishnan, K. R., Charles, H. C. and Doraiswamy, P. M., Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry*, 160, 2003-2011, 2003.
- Kurata, K., Taniguchi, K., Shiraishi, K. and Suzuki, M., Ecklonialactone C—F from the

- brown algae *Ecklonia stolonifera*. *Phytochemistry*, 33, 155-159, 1993.
- Kurata, K., Taniguchi, K., Shiraishi, K., Hayama, N., Tanaka, I. and Suzuki, M., Ecklonialactone-A and-B, two unusual metabolites from the brown algae *Ecklonia stolonifera* Okamura. *Chem. Lett.*, 267-270, 1989.
- Kurihara, H., Mitani, T., Kawabata, J. and Takahashi, K., Inhibitory potencies of bromophenols from rhodomelaceae algae against alpha-glucosidase activity. *Fish. Sci.*, 65, 300-303, 1999a.
- Kurihara, H., Mitani, T., Kawabata, J. and Takahashi, K., Two new bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *J. Nat. Prod.*, 62, 882-884, 1999b.
- Lee, J. H., Lee, K. T., Yang, J. H., Baek, N. L. and Kim, D. K., Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 53-56, 2004a.
- Lee, J. H., Lee, Y. M., Lee, J. J. and Lee, M. Y., Effect of *Capsosiphon fulvescens* extract on lipid metabolim in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 402-409, 2006.
- Lee, J. H., Oh, H. Y. and Choi, J. S., Preventive effect of *Ecklonia stolonifera* on the frequency of benzo(a)pyrene-induced chromosomal aberrations. *J. Food. Sci. Nutr.*, 1, 64-68, 1996a.
- Lee, J. H., Park, J. C. and Choi, J. S., The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, 19, 223-227, 1996b.
- Lee, J. H., Pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Hanyang Medical Reviews*, 28, 26-32, 2006.
- Lee, J. M., Choi, S. W., Cho, S. H. and Rhee, S. J., Effect of seeds extract of *Paeonia lactiflora* on antioxidative system and lipidperoxidation of liver in rats fed high-cholesterol diet. *Korean J. Nutr.*, 36, 793-800, 2003.
- Lee, S., Lee, Y. S., Jung, S. H., Kang, S. S. and Shin, K. H., Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Phram. Res.*, 26, 719-722, 2003.
- Lee, Y. S., Shin, K. H., Kim, B. K. and Lee, S., Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Phram. Res.*, 27, 1120-1122, 2004b.

- Levy, R. I., Cholesterol, lipoprotein, apoproteins and heart disease: present status and future prospects. *Clin. Chem.*, 27, 653-662, 1981.
- Li, S. M. and Glombitza, K. W., Carmalols and phloretholfulhalols from the brown alga *Carpophyllum maschalocarpum*. *Phytochemistry*, 30, 3417-3421, 1991.
- Libby, P., Aikawa, M. and Schinbeck, U., Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1529, 299-309, 2000.
- Lim, S. S., Jung, Y. J., Hyun, S. K., Lee, Y. S. and Choi, J. S., Lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. *Phytother. Res.*, 20, 825-830, 2006.
- Mack, A. and Robitzki, A., The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'-butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.*, 60, 607-628, 2000.
- Malone, J. I., Knox, G., Benford, S. and Tedesco, T. A., Red cell sorbitol. An indicator of diabetic control. *Diabetes*, 29, 861-864, 1980.
- Manna, P., Sinha, M. and Sil, P. C., Protection of arsenic-induced hepatic disorder by arjunolic acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 333-338, 2007.
- McKenney, J. M., Pharmacotherapy of dyslipidemia. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 15, 413-422, 2001.
- Megalli, S., Aktan, F., Davies, N. M. and Roufogalis, B. D., Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8, 507-515, 2005.
- Melzer, D., New drug treatment for Alzheimer's disease: lesson for healthcare policy. *BMJ.*, 316, 762-764, 1998.
- Michanek, G., Seaweed resources for pharmaceutical uses. In *Marine Algae in Pharmaceutical Science* Hoppe, H. A., Levring, T., Tanaka, Y., (eds) Walter de Gruyter: Berlin. New York. 1979.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., Brodie, B. B., Acetaminophen induced hepatic necrosis. Protective role of glutathione. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 211-215, 1973.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

- proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63, 1983.
- Myoung, C. S., Shin, H. C., Bao, H. Y., Yeo, S. J., Lee, B. H. and Kang, J. S., Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol-A in ethanol-treated mice: Possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. *Arch. Pharm. Res.*, 28, 691-698, 2005.
- Naaz, F., Javed, S. and Abdin, M. Z., Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. on aflatoxin B₁-induced liver damage in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 113, 503-509, 2007.
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K. and Tanaka, R., Antioxidant activity of phlorotannin isolated from the brown alga *Eisenia bicylis*. *Fish. Sci.*, 62, 923-926, 1996.
- Nash, V. J., Johnson, T. P. and Plamer, W. K., Effects of nicotinic acid poloxamer 407-induced hyperlipidemia. *Pharmacotherapy*, 16, 10-15, 1996.
- National Institute of Clinical Excellence, Guidance on the use of donepezil, rivastigmine and galantamine, 2001.
- Nigon, F., Serfaty-Lacrosniere, C., Beucler, I., Beucler, I., Chauvois, D., Neveu, C., Giral, P., Chapman, M. J. and Bruckert, E., Plant sterol-enriched margarine lowers plasma LDL in hyperlipidemic subjects with low cholesterol intake: effect of fibrate treatment. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39, 634-640, 2001.
- Ninomiya, K., Morikawa, T., Zhang, Y., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O. and Yoshikawa, M., Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXIII. Absolute structures of new magastigmane glycosides, sedumosides A₄, A₅, A₆, H and I, and hepatoprotective magastigmanes from *Sedum sarmentosum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 1185-1191, 2007.
- Oh, H. C., Kim, D. H., Cho, J. H. and Kim, Y. C., Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol.*, 95, 421-424, 2004.
- Oh, H., Kim, J. S., Song, E. K., Cho, H., Kim, D. H., Park, S. E., Lee, H. S. and Kim, Y. C., Sesquiterpenes with hepatoprotective activity from *Cnidium monnieri* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Planta Med.*, 68, 748-749, 2002a.

- Oh, H., Lee, H. S., Kim, T., Chai, K. Y., Chung, H. T., Kwon, T. O., Jun, J. Y., Jeong, O. S., Kim, Y. C. and Yun, Y. G., Furocoumarins from *Angelica dahurica* with hepatoprotective activity on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Planta Med.*, 68, 463-464, 2002b.
- Oh, I. S., Kang, J. A. and Kang, J. S., Gender difference in the effects of gonadectomy and hypercholesterol diet on plasma and liver cholesterol and triglyceride levels, platelet aggregation and liver tissue in Sprague rats. *Korean J. Nutr.*, 35, 15-23, 2002c.
- Okada, Y., Ishimura, A., Suzuki, R. and Okuyama, T., A new phloroglucinol derivative from the brown alga *Eisenia bicyclis*: potential for the effective treatment of diabetic complications. *J. Nat. Prod.*, 67, 103-105, 2004.
- Oliveros, L. B., Videla, A. M., Ramirez, D. C. and Gimenez, M. S., Dietary fat saturation produces lipid modifications in peritoneal macrophage of mouse. *J. Nutr. Biochem.*, 14, 370-377, 2003.
- Orecnius, S. and Moldeus, P., The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *TIPS.*, 5, 432-435, 1984.
- Orhan, I., Terzioglu, S. and Sener, B., Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.*, 69, 265-267, 2003.
- Osseni, R. A., Debbasch, C., Christen, M. O., Rat, P. and Warnet, J. M., Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: the role of anethole dithiolethione as a scavenger. *Toxicol. In Vitro*, 13, 683-688, 1999.
- Park, H. J., Lee, H. J., Jung, H. A. and Choi, J. S., Nitrite scavenging activity of bromophenol congeners from *Symphyclocladia latiuscula*. *J. Fish. Sci. Tech.*, 4, 47-49, 2001.
- Parmer, N. S. and Ghosh, M. N., Effect of gossypin, a flavonoid, on the formation of galactose-induced cataracts in rats. *Exp. Eye Res.*, 29, 229-232, 1979.
- Pavia, H. and Toth, G., Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, 81, 3212-3225, 2000a.
- Pavia, H. and Toth, G., Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia*, 440, 299-305, 2000b.

- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. and Aberg, P., Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannin in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157, 139-146, 1997.
- Pazzucconi, F., Dorigotti, F., Gianfranceschi, G., Campagno, I. G., Sirtori, M., Franceschini, G. and Sirtori, C. R., Therapy with HMG CoA reductase inhibitors: characteristics of the long-term permanence of hypocholesterolemic activity. *Atherosclerosis*, 117, 189-198, 1995.
- Peckol, P., Krane, J. M. and Yates, J. L., Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannin in the North Atlantic brown alga *Fucus vesiculosus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138, 209-217, 1996.
- Perry, N. S., Houghton, P. J., Theobald, A., Jennar, P. and Perry, E. K., *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 895-902, 2000.
- Qizibash, N., Schneider, N. S. and Chui, H., Evidence-based Dementia Practice, Oxford: Blackwell Science Ltd., 2002.
- Regan, M. A. and Jamieson, W. D., Oligomeric polyphloroglucinols from *Fucus vesiculosus*: Photoplate mass spectrometric investigation. *Phytochemistry*, 21, 2709-2711, 1982.
- Rahman, A. U., Akhtar, M. N., Choudhary, M. I., Tsuda, Y., Sener, B., Khalid, A. and Parvez, M., New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 1013-1016, 2002.
- Rahman, A. U., Parveen, S., Khalid, A., Farooq, A. and Choudhary, M. I., Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. *Phytochemistry*, 58, 963-968, 2001.
- Rahman, A. U., Wahab, A. T., Nawaz, S. A. and Choudhary, M. I., New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cocculus pendulus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 802-806, 2004.
- Rakinczay, Z. and Brimijoin, S., Biochemistry and pathophysiology of the molecular forms of cholinesterase. *Subcell Biochem.*, 12, 335-378, 1988.
- Raymond, J., Metcalfe, A., Salazkin, I. and Schwarz, A., Temporary vascular occlusion

- with poloxamer 407, *Biomaterials*, 25, 3983-3989, 2004.
- Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A. and Waller, R. L., Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Therapeut.*, 43, 139-154, 1989.
- Regan, M. A. and Glombitza, K. W., Phlorotannin, brown algal polyphenols. pp.129-241, in Round and Champman (eds.). *Progress in Phycological Research*, Vol. 4., Biopress Ltd., 1986.
- Ren, D., Noda, H., Amano, H., Nishino, T. and Nishizawa, K., Study on antihypertensive and antilipidemic effects marine algae. *Fish. Sci.*, 60, 83-88, 1994.
- Ricci, E. J., Lunardi, L. D., Nauclares, D. M. and Marchetti, J. M., Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.*, 288, 235-244, 2005.
- Ro, H. S., Kim, O. J., Park, K. K., Cho, T. H. and Park, H. S., Studies on diet regimens for the development of hyperlipidemic animal model. *J. Kor. Pharm. Sci.*, 24, 297-321, 1994.
- Ryu, G. S., Park, S. H., Kim, E. S., Choi, B. W., Ryu, S. Y. and Lee, B. H., Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 796-799, 2003.
- Sanna, V., Kirschvink, N., Gustin, P., Garini, E., Roland, I., Delattre, L. and Evrard, B., Preparation and *in vivo* toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5, e27, 2004.
- Santhosh, S., Sini, T. K., Anandan, R. and Mathew, P. T., Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 572, 69-73, 2007.
- Sato, Y. and Rifkin, D. B., Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transformation growth factor B1-like molecule by plasmin during coculture. *J. Cell. Biol.*, 109, 309-315, 1989.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M., Perry, E. K., Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75, 661-668, 2003.
- Schmolka, I. R., Poloxamers in the pharmaceutical industry. In: Tarch, P. J., ed. *Polymers for controlled drug delivery*. Boca Raton: CSC Press, 189-215, 1991.

- Schulz, V., Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10, 74–79, 2003.
- Sequist, E. R., Goetz, F. C., Rich, S. and Barbosa, J., Familial clustering of diabetic kidney disease: Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *New Eng. J. Med.*, 320, 1161-1165, 1989.
- Sehrawat, A., Khan, T. H., Prasad, L. and Sultana, S., Butea monosperma and chemomodulation: protective role against thioacetamide-mediated hepatic alterations in Wistar rats. *Phytomedicine*, 13, 157-163, 2006.
- Seiburth, J. M. and Conover, J. T., *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature*, 208, 52-53, 1965.
- Sheu, J. H., Wang, G. H., Sung, P. J., Chiu, Y. H. and Duh C. Y., Cytotoxic sterols from the Formosan brown alga *Turbiaria ornata*. *Planta Med.*, 63, 571-572, 1997.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K. and Nakamura, T., Inhibitory activity of brown algal phlorotannin against hyaluronidase. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 703-709, 2002b.
- Shibata, T., Yamaguchi, K., Nagayama, K., Kawaguchi, S. and Nakamura, T., Inhibitory activity of brown algal phlorotannin against glycosidases from the viscera of the turban shell *Turbo cornutus*. *Eur. J. Phycol.*, 37, 493- 500, 2002a.
- Silman, I. and Sussman, J. L., Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5, 293-302, 2005.
- Small, G. W., Robins, R. V., Barry, P. P., Buckholts, N. S., Dekosky, S. T., Ferris, S. H., Finkel, S. I., Gwyther, L. P., Khachaturian, Z. S., Lebowitz, B. D., McRae, T. D., Morris, J. O., Oakley, F., Schneider, L. S., Streim, J. E., Sunderland, T., Teri, L. A. and Tune, L. E., Diagnosis and treatment of Alzheimer’s disease and related disorder. *JAMA.*, 278, 1363–1371, 1997.
- Song, E. K., Cho, H., Kim, J. S., Kim, N. Y., An, N. H., Kim, J. A., Lee, S. H. and Kim. Y. C., Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity *in vitro* from *Curcuma longa*. *Planta Med.*, 67, 876-877, 2001.
- Song, Z., Song, M., Lee, D. Y. W., Lie, Y., Deaciuc, I. V. and McClain, C. J., Silymarin prevents palmitate-induced lipotoxicity in Hep G2 cells: involvement of maintenance

- of Akt kinase activation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 262-268, 2007.
- Soreq, H. and Seidman, S., Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 294-302, 2001.
- Srivastava, R. and Kulshreshtha, D. K., Bioactive polysaccharide from plants. *Phytochemistry*, 28, 2877-2833, 1989.
- Steinberg, P. D., The effects of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 120, 221-382, 1988.
- Sugira, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai, K. and Amano, H., Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorafucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2807-2811, 2006.
- Swanson, A. K. and Druehl, L. D., Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannin. *Aquat. Bot.*, 73, 241-253, 2002.
- Talbert, R., Hyperlipidemia, *DePiro Textbook of Therapeutics*, Appleton and Lange, Connecticut, 357-386, 1997.
- Tang, H. F., Yang-Hua, Y., Yao, X. S., Xu, Q. Z., Zhang, S. Y. and Lin, H. W., Bioactive steroids from the brown alga *Sargassum carpophyllum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 4, 95-101, 2002.
- Taniguchi, K., Kurata, K. and Suzuki, M., Feeding-deterrent effect of phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera* against the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2065-2071, 1991.
- Targett, N. M. and Arnold, T. M., Predicting the effects of brown algal phlorotannin on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.*, 34, 195-205, 1998.
- Targett, N. M., Coen, L. D., Boettcher, A. A. and Tanner, C. E., Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics: Evidence against a latitudinal trend. *Oecologia*, 89, 464-470, 1992.
- Travis, S. F., Morrison, A. D., Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I. and Oski, F. A., The role of the polyol pathway in methemoglobin reduction in human red cells. *Br. J.*

- Haematol.*, 27, 597-605, 1974.
- Ucar, G., Gokhan, N., Yesilada, A. and Bilgin, A. A., 1-*N*-substituted thiocarbomoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-prozolines: a novel cholinesterase and selected monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters*, 382, 327-331, 2005.
- Urbain, A., Marston, A., Queriroz, E. F., Ndjoko, K. and Hostettmann, K., A new coumarin from *Murraya paniculata*. *Planta Med.*, 70, 1011-1014, 2004.
- Uskokovic-Markovic, S., Milenkovic, M., Topic, A., Kotur-Stevujevic, J., Stefanovic, A. and Antic-Stankovic, J., Protective effects of tungstophosphoric acid and sodium tungstate on chemically induced liver necrosis in wistar rats. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 10, 340-349, 2007.
- Van Beek, K. L., McCarthy III, J. J., Hustead, C. L. and Kearns, L. J., Phlorotannin allocation among tissues of northeastern pacific kelps and rockweeds. *J. Phycol.*, 35, 482-492, 1999.
- Verma, S. D. and Kinoshita, J. H., Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids- their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2505-2513, 1976.
- Viau, C. J., Curren, R. D. and Wallace, K., Cytotoxicity of tacrine and velnacrine metabolites in cultured rat, dog and human hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.*, 16, 227-239, 1993.
- Vries, J. D., Hepatotoxicity metabolic activation of paracetamol and its derivatives phenacetin and benorilate: oxygenation or electron transfer. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 339-402, 1984.
- Wald, N. J. and Law, M. R., Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*, 118, S1-S5, 1995.
- Wang, C. and Yang, G., Comparison of effects of two kinds of soluble algae polysaccharide on blood lipid, liver lipid, platelet aggregation and growth in rats. *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih*, 31, 342-345, 1997.
- Waterman, P. G. and Mole, S., (eds.) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific, Oxford, 1994.

- Watkins, P. S., Zimmeman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I. and Lewis, K. W., Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 271, 992-998, 1994.
- Weber, L. W. D., Bull, M. and Stampfl, A., Hepatoprototoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.*, 33, 105-136, 2003.
- Wiemer, D. F., Idler, D. D. and Fenical, W., Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. *Experientia.*, 47, 851-853, 1991.
- Wikstrom, S. A. and Pavia, H., Chemical settlement inhibition versus postsettlement mortality as an explanation for differential fouling of two congeneric seaweeds. *Oecologia*, 138, 223-230, 2004.
- Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengard, J. R., Van Den Enden, M., Kilo, C. and Tilton, R. G., Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, 801-813, 1993.
- Wong, C. K., Ooi, V. E. C. and Ang, P. O., Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere*, 41, 173-176, 2000.
- Wout, Z. G., Pec E. A., Maggiore, J. A., Williams, R. H., Palicharla, P. and Johnson, T. P., Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats. *J. Parenter. Sci. Technol.*, 46, 192-200, 1992.
- Xu, N., Fan, X., Yan, X., Li, X., Niu, R. and Tseng, C. K., Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*, 62, 1221-1224, 2003.
- Yamada, K., Tokunaga, Y., Ikeda, A., Ohkura, K., Kaku-Ohkura, S., Mamiya, S., Lim, B. O. and Tachibana, H., Effect of dietary fiber on the lipid metabolism and immune function of aged Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 429-433, 2003.
- Yapar, K., Kart, A., Karapehlivan, M., Atakisi, O., Tunca, R., Erginsoy, S. and Cital, M., Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 59, 121-128, 2007.

- Yasuda, S., Townsend, D., Michele, D. E., Favre, E. G., Day, S. M. and Metzger, J. M., Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature*, 436, 1025-1029, 2005.
- Yates, J. C. and Peckol, P., Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolic in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology*, 74, 1757-1766, 1993.
- Yokozawa, T., Cho, E. J., Sasaki, S., Satoh, A., Okamoto, T. and Sei, Y., The protective role of Chinese prescription kangen-kayu extract on diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 760-765, 2006.
- Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Kitani, K., Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3549-3552, 2002.
- Yoo, I. D., Cho, K. M., Lee, C. K. and Kim, W. G., Isoterreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity produced by *Aspergillus terreus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 353-356, 2005.
- Yu, S. Q., Utsuki, H. W., Brossi, T. and Greig, A. N. H., Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.*, 42, 1855-1861, 1999.
- Zhao, J., Fan, X., Wang, S., Li, S., Shang, S., Yang, Y., Xu, N., Lu, N. and Shi, J., Bromophenol derivatives from the red alga *Rhodomela confervoides*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1032-1035, 2004.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 분들의 도움과 관심이 있었기에 가능했습니다. 이 자리를 빌어 그 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 많이 부족한 저에게 변함없는 관심과 가르침으로 이끌어 주시고, 따뜻한 격려와 아낌없는 사랑으로 감싸주시며, 학문에 대한 한결 같은 열정과 참된 연구자의 모습을 몸소 보여주신 최재수 교수님께 깊은 존경과 감사의 마음을 전합니다.

또한 바쁘신 와중에 부족한 논문을 심사해주시고, 조언을 해주신 최진호 교수님, 좋은 논문을 쓸 수 있도록 세심하게 교정해 주신 류은순 교수님, 김형락 교수님, 신라대학교 하배진 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 평소에 큰 가르침을 주신 류홍수 교수님, 변대석 교수님, 남택정 교수님께도 감사드립니다.

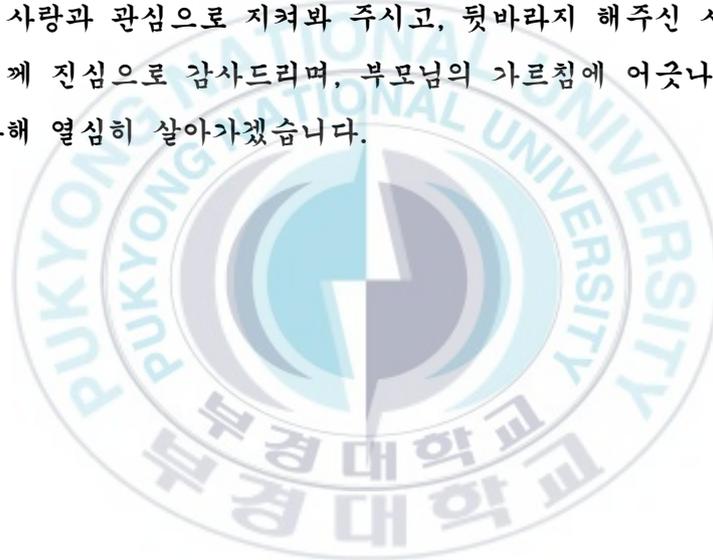
실험실에서 소중한 시간을 함께한 여러 선·후배님들께도 감사의 마음을 전합니다. 특히, 실험실 선배이신 박혜진 선생님, 혜숙 언니께 감사의 마음을 전합니다. 후배에게 격려와 많은 조언을 해준 현아언니, 멀리 있지만 힘들 때마다 위로와 격려로 큰 힘이 되어준 미정언니, 항상 열심히 하는 모습으로 모범이 되어준 숙경언니, 항상 큰 언니처럼 후배를 배려해주고 챙겨준 유정언니, 학부때부터 지금까지 친언니처럼 아껴주고 많은 조언을 해준 고마운 정은언니, 항상 따뜻한 격려를 해준 주정언니, 내 일을 자신의 일처럼 항상 걱정해주는 사랑하는 친구 희진이, 열심히 공부하라고 격려전화 해주는 춘환씨, 많은 시간을 함께 하지 못해서 아쉬웠던 향이언니, 부족한 선배지만 잘 따라준 후배 다미와 현주, 새로운 식구가 된 김현미님께도 감사드립니다. 짧은 시간이었지만 함께 실험했던 동명씨, 실험을 많이 도와준 학부생 다은이, 지영이, 지은이, 두 진영이, 선영이, 상희, 소영이에게도 고마움을 전합니다. 그리고 그 외에 많은 도움을 주신 대학원 선·후배님들께도 감사드립니다.

실험을 가르쳐주신 한림대학교 임순성 교수님과 부산대학교 지영언니에게 감사드립니다. 그리고 공실관 연구원 선생님들 특히, 박성민 선생님, 이상미 선생님, 지성희 선생님, 황인자 선생님께 감사의 마음을 전합니다.

얼굴도 자주 보지 못하고 힘들 때 옆에 있어주지도 못하는 부족한 친구지만, 밥은 잘 챙겨 먹는지, 아프지는 않는지 항상 걱정해주고 힘들 때마다 많은 위로와 격려해 준 친구들에게도 고마움을 전합니다.

바쁘다는 핑계로 자주 찾아뵙진 못하지만, 항상 손녀딸을 걱정해주시는 할머니, 학위 받는 걸 보지 못하고 돌아가셨지만, 항상 친딸처럼 아껴주시고, 돌아가시기 직전까지도 공부 열심히 하라고 격려해 주시고, 힘이 되어주신 셋째 이모와 이모부께 진심으로 감사드립니다.

동생을 진심으로 아껴주고 걱정해주는 하나밖에 없는 오빠, 부족한 딸을 헌신적인 사랑과 관심으로 지켜봐 주시고, 뒷바라지 해주신 사랑하는 어머니와 아버지께 진심으로 감사드리며, 부모님의 가르침에 어긋나지 않도록 항상 최선을 다해 열심히 살아가겠습니다.



2007년 12월

윤나영 올림