



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

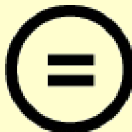
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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 석 사 학 위 논 문

식용 갈조류 다시마의 최종당화산물과
흰쥐 망막 알도즈 환원효소에
대한 억제효과



2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

손유경

이 학 석 사 학 위 논 문

식용 갈조류 다시마의 최종당화산물과
흰쥐 망막 알도즈 환원효소에
대한 억제효과

지도교수 최재수

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

손유경

손유경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2011년 2월 23일



주 심 이학박사 김 형 락 인

위 원 농학박사 남 택 정 인

위 원 약학박사 최 재 수 인

목 차

LIST OF SCHEMES	i
LIST OF TABLES	ii
LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	iv
LIST OF SYMBOLS	v
ABSTRACT	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 실험방법	10
1. 재료	10
2. 시약 및 기기	10
2-1. 시약	10
2-2. 기기	11
3. 실험방법	11
3-1. 추출 및 분획	11
3-2. 화합물의 분리	14
3-2-1. CH_2Cl_2 획분의 활성성분 분리	14
3-2-2. CH_2Cl_2 획분에서 분리된 성분의 분광학적 성질	17
3-3. 항당뇨 합병증 실험	20
3-3-1. 최종당화산물 형성억제 활성 실험	20

3-3-2. Lens aldose reductase 억제활성 실험	22
3-4. HPLC 분석	24
3-4-1. 표준용액 제조 및 검량곡선	24
3-4-2. 시료준비	24
3-4-3. HPLC 분석 조건	24
III. 결과 및 고찰	27
1. 다시마의 CH_2Cl_2 분획물에서 분리된 화합물의 구조결정	27
2. 생리활성 실험	33
2-1. 항당뇨 합병증 실험	33
2-1-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성 억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성	33
2-1-2. 분리된 화합물들의 최종당화산물 형성 억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성	37
2-1-3. Porphyrin계 화합물들의 최종당화산물 형성 억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성	41
3. 다시마 추출물로부터의 Compound 1과 2의 정량분석	46
3-1. 다시마로부터 분리된 화합물의 검량곡선 검토	46
3-2. 다시마 추출물의 Compound 1과 2의 정량분석	48
IV. 요약 및 결론	51
V. 참고문헌	58

LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
Scheme 1. Extraction and fractionation of <i>Laminaria japonica</i> -----	13
Scheme 2. Isolation of compounds 1 and 2 from CH ₂ Cl ₂ fraction of <i>Laminaria japonica</i> -----	16
Scheme 3. Assay of AGE formation inhibitory activity -----	21
Scheme 4. Assay of rat lens aldose reductase inhibitory activity -----	23



LIST OF TABLES

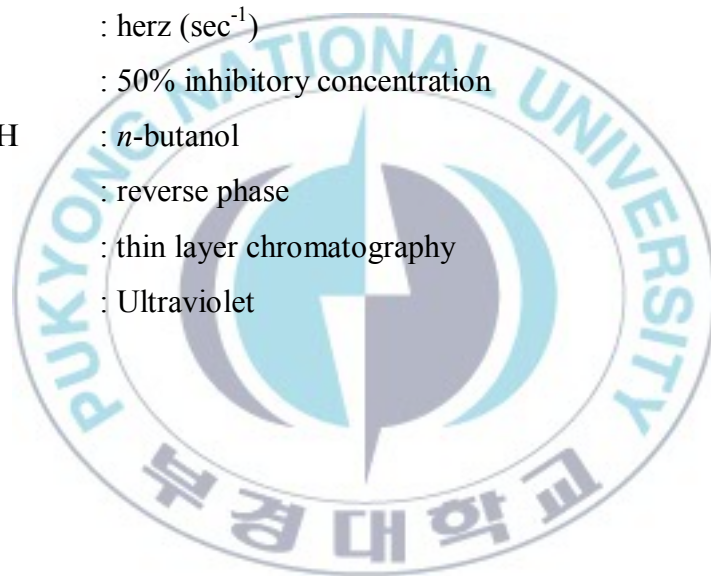
Table	Page
Table 1. HPLC analytical condition of pheophorbide a and pheophytin a -----	26
Table 2. ¹ H- and ¹³ C-NMR spectral data of compound 1 in CDCl ₃ -----	30
Table 3. ¹ H- and ¹³ C-NMR spectral data of compound 2 in CDCl ₃ -----	32
Table 4. <i>In vitro</i> activities of methanolic extract and its fractions from <i>L. japonica</i> on RLAR and AGEs formation -----	35
Table 5. <i>In vitro</i> activities of pheophorbide a and pheophytin a from <i>L. japonica</i> on RLAR and AGEs formation -----	40
Table 6. <i>In vitro</i> inhibitory activities of commercially available porphyrin derivatives on RLAR and AGE formation -----	45
Table 7. Contents of the pheophorbide a and pheophytin a in the MeOH, CH ₂ Cl ₂ and acetone extracts of <i>L. japonica</i> -----	50

LIST OF FIGURES

Figure	Page
Fig. 1. Formation of advanced glycation endproducts -----	4
Fig. 2. Polyol pathway and AGEs formation in hyperglycemia -----	9
Fig. 3. Structures of the compounds 1 and 2 isolated from <i>Laminaria japonica</i> -----	19
Fig. 4. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃ -----	29
Fig. 5. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃ -----	29
Fig. 6. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ -----	31
Fig. 7. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CDCl ₃ -----	31
Fig. 8. Inhibitory effect of methanolic extract and its fractions from <i>L. japonica</i> on RLAR and AGEs formation -----	36
Fig. 9. Structures of isolated pheophorbide a and pheophytin a from <i>L. japonica</i> and porphyrin derivatives used in this study -----	44
Fig. 10. Calibration curves of pheophorbide a (A) and pheophytin a (B) from <i>L.</i> <i>japonica</i> -----	47
Fig. 11. HPLC chromatograms of MeOH (A), CH ₂ Cl ₂ (B) and acetone (C) extract from <i>L. japonica</i> -----	49
Fig. 12. Contents of the pheophorbide a and pheophytin a in the MeOH, CH ₂ Cl ₂ and acetone extracts of <i>L. japonica</i> -----	50

ABBREVIATIONS

CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C-NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
CDCl ₃	: deuterium chroloform
EtOAc	: ethyl acetate
EtOH	: ethanol
Fig.	: Figure
H ₂ O	: water
¹ H-NMR	: proton nuclear magnetic resonance
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol
RP	: reverse phase
TLC	: thin layer chromatography
UV	: Ultraviolet



LIST OF SYMBOLS

J	Coupling constant (Hz)
δ	Chemical shift



Inhibitory activities of edible brown alga *Laminaria japonica* on glucose-mediated protein damage and rat lens aldose reductase

You Kyung Son

Department of Food and Life science, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The sea tangle, *Laminaria japonica* Areschoung, is a brown alga, which belongs to the family Laminariaceae and is widely distributed throughout Korea, Japan, China and France. This alga has long been used as common seafood as well as traditional medicines to promote maternal health. Previously, it has been reported for several biological activities such as scavenging activity against free radicals, antimutagenic activity, down-regulation of blood glucose in diabetic rats, inhibitory effects on oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver and protective effects on high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. However, inhibitory activities of *L. japonica* on advanced glycation end products (AGEs) formation and rat lens aldose reductase (RLAR) had not been investigated. Increased aldose reductase related polyol pathway and formation and accumulation of AGEs have been implicated in the onset of many diabetic complications, including atherosclerosis, cardiac dysfunction, retinopathy, neuropathy and nephropathy. In the present study, the effects of methanolic (MeOH) extract and its fractions including dichloromethane (CH₂Cl₂),

ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) and water (H₂O) from *L. japonica* against diabetic complications *via in vitro* assays, such as RLAR and AGEs formation inhibitory activities were evaluated. The MeOH extract showed promising inhibitory activities on both AGEs formation and RLAR, with IC₅₀ value of 1,206.08 ± 21.29 µg/ml against AGEs formation and inhibition percentage of 27.44 ± 1.13% at 100 µg/ml against RLAR. Among several fractions, the EtOAc fraction manifested potent AGEs formation inhibitory activity with IC₅₀ value of 150.32 ± 2.84 µg/ml. Furthermore, the EtOAc fraction showed the highest inhibitory activity on RLAR, with inhibition percentage of 50.83 ± 0.12% at a concentration of 100 µg/ml. In addition, the CH₂Cl₂ fraction exhibited noticeable inhibitory activity of AGEs formation with IC₅₀ value of 167.65 ± 1.76 µg/ml. The CH₂Cl₂ fraction also inhibited the RLAR at a concentration of 100 µg/ml by 30.24 ± 0.38%. Though the CH₂Cl₂ fraction was less active than EtOAc fraction in both RLAR and AGEs formation assays, it showed higher yield than EtOAc fraction. Therefore, the CH₂Cl₂ fraction was selected for chromatographic separation of active compounds using silica gel, RP-18 and Diaion HP-20 column chromatographies to yield two compounds **1** (pheophorbide a) and **2** (pheophytin a). The chemical structures of both compounds were elucidated by 1D NMR (¹H & ¹³C-NMR), and confirmed by comparing with their published spectral data. Both **1** and **2** were isolated from *L. japonica* for the first time. The present study, the inhibitory effects of **1** and **2** from *L. japonica* against AGEs formation and RLAR were measured. **1** exhibited potent inhibitory activities against both AGEs formation and RLAR, with IC₅₀ values of 49.4 and 12.3 µM, respectively. On the other hand, **2** was found to be active against AGEs formation, with IC₅₀ 228.7 µM. For the further elucidation of the structure-inhibitory activity relationship of porphyrin

derivatives, the inhibitory activities of commercially available four porphyrin derivatives and two active porphyrin derivatives isolated from *L. japonica* on both AGEs formation and RLAR were compared. Among the commercially available porphyrin derivatives, protoporphyrin IX exhibited moderate activity on RLAR, with the IC₅₀ value of 55.5 μ M, compared with **1** (12.31 μ M) and quercetin (1.17 μ M). On the other hand, hemin showed marginal inhibitory activity with on RLAR an IC₅₀ value of 101.3 μ M. In contrast, chlorophyll a and hematin showed no activity toward RLAR. In AGEs formation assays, not only **1** and **2** from *L. japonica* but also commercially available porphyrin derivatives have inhibitory effect on AGEs formation greater than positive control, aminoguanidin (IC₅₀ 735.7 μ M). Protoporphyrin IX and chlorophyll a exhibited potent activity, evidencing the IC₅₀ values of 42.1 and 69.5 μ M, respectively. On the other hand, hemin and hematin showed marginal inhibitory activity with the IC₅₀ values of 280.9 and 299.14 μ M, respectively. Taken together, **1** and protoporphyrin IX exhibited potent significant effects against both AGEs formation and RLAR, indicating that the presence of carboxyl group and the absence of phytol group at the C-17 position of porphyrin derivatives seem to play key roles on the inhibitory effects of AGEs formation and RLAR. In order to determine the optimized extraction conditions of **1** and **2**, *L. japonica* were extracted with different kinds of solvents such as MeOH, CH₂Cl₂ and acetone, and then quantitative analysis of **1** and **2** in the various extract of *L. japonica* was simultaneously performed using HPLC-UV detector system. The peaks of **1** and **2** were revealed at approximately 16.00 and 45.85 min in the three extracts. The contents of **1** and **2** in the MeOH extract were 0.3 and 2.24 mg/g extract, respectively. In the CH₂Cl₂ extract, content of compound **1** and **2** were 1.13 and 14.3 mg/g extract, respectively. The contents of **1** and **2** in

acetone extract were 3.15 and 42.93 mg/g extract, respectively. These results indicated that acetone is optimized extracting solvent for extraction of these active constituents.

In the present study, these results demonstrated that the MeOH extract and its CH₂Cl₂ fraction as well as pheophorbide a and pheophytin a from *L. japonica* exhibited potent effects of anti-diabetic complications *via* inhibition of AGEs formation and RLAR, suggesting that *L. japonica* and pheophorbide a and pheophytin a from *L. japonica* might potential utilization of functional food resource to prevent for diabetic complications.



I. 서론

당뇨병은 대표적인 만성 성인병의 하나로, 생활수준의 향상과 더불어 식습관과 생활양식이 서구화되면서 당뇨병의 유병률 및 사망률이 꾸준히 증가하고 있다 (김응진 등, 1998). 대한당뇨병학회 역학 TFT 와 건강보험심사평가원의 공동 연구에 따르면, 2003 년 우리나라의 성인 인구 중 약 286 만명인 약 5.92%가 당뇨병을 앓고 있으며, 2030 년에는 그 수가 급격히 증가하여 545 만명(10.85%)에 육박할 것으로 예상하고 있다 (Task Force Team, 2007). 또한, 우리나라의 당뇨병 환자의 사망률은 경제협력개발기구 (OECD) 국가 중 최고 수준으로, 1990 년에 9.9%였던 당뇨병 환자의 사망률이 2008 년에는 20.7%로 그 비율이 계속해서 증가하고 있는 추세이다 (Kim and Choi, 2008; 보건복지가족부, 2009). 당뇨병은 그 자체로도 위험하나 지속적인 고혈당 상태는 더욱 위험성을 지니는 당뇨병성 망막증, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 백내장 등의 미세혈관 합병증과 협심증, 심근경색, 심부전과 같은 대혈관 합병증을 유발한다 (Seaquist *et al.*, 1989). 이러한 당뇨합병증은 당뇨병 환자의 사망률 증가 및 삶의 질 저하를 가져올 뿐만 아니라, 직·간접적인 사회적 비용의 증가를 초래한다. 실제로, 우리나라의 3 차 의료기관에 내원한 당뇨병환자의 1 년 평균 의료비용에 대해 조사한 결과, 합병증이 없는 당뇨병군의 의료비용에 비해 미세혈관 합병증이 있는 경우 4.7 배, 대혈관 합병증이 있는 경우 10.7 배, 두 가지 모두를 가지는 경우가 8.8 배 상승하는 것으로 나타났다 (Hwang *et al.*, 2008). 따라서, 당뇨합병증을 예방·치료함으로써

당뇨병 환자의 사망률 감소는 물론 환자 개인의 삶의 질 향상과 사회·경제적 의료 비용의 감소를 기대할 수 있다.

당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway 의 이상 (Sato and Rifkin, 1989), 체내에서 고혈당과 단백질의 결합, 산화적 스트레스 (Williamson *et al.*, 1993), myoinositol 의 감소와 Na^+ , K^+ -ATPase 활성의 감소 (Greene *et al.*, 1987)등이 발표되었다. 그 중 polyol pathway 는 포도당 대사경로의 하나로, 이는 포도당이 솔비톨을 거쳐 과당으로 변환되는 경로로 두 개의 반응계로 구성되며, 2 종의 효소가 관여한다 (Gabbay and O'Sullivan, 1968; Dvornik *et al.*, 1973). 포도당은 에너지원으로 이용되는 중요한 물질로서 정상인의 경우 세포 내에 흡수된 후에 대부분은 hexokinase 에 의하여 glucose-6-phosphate 로 전환되어 해당계에서 대사되고, 불과 몇 % 만이 polyol pathway 를 거쳐 대사된다 (Collins and Corder, 1977). 그러나 당뇨병에 의해 고혈당 상태가 되면 세포 내로의 포도당 흡수가 인슐린에 의존하지 않고 세포 밖의 포도당 농도에 의존하므로 수정체, 망막, 각막, 말초신경, 혈관, 신사구체, 적혈구 등과 같은 인슐린 비의존성 조직의 세포 내 포도당 농도는 상승하게 되고, 이들 세포 내에 다량 존재하는 polyol pathway 의 필수효소인 알도스 환원효소에 의하여 포도당의 대사가 항진되어 솔비톨이 과잉생성된다 (Collins and Corder, 1977; Dvornik *et al.*, 1973). 그 결과 솔비톨이 축적되는 부위에 따라 발병 증상이 나타나는데, 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증, 당뇨병 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으키게 된다 (Heath and Hamlett, 1976). 알도스 환원효소에 의해 축적되는 포도당에서

솔비톨로의 환원반응은 그 평형에서 역반응이 일어나지 않으며, sorbitol dehydrogenase 의 활성은 알도즈 환원효소의 활성보다 낮기 때문에 솔비톨에서 과당으로의 변환량이 아주 적으므로 결과적으로 polyol pathway 의 항진은 솔비톨의 축적을 야기한다 (Collins and Corder, 1977). 당알콜인 솔비톨은 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에 세포 내에 축적되며, 이로 인해 세포 내 삼투압을 상승시켜 수정체 내로 수분유입을 촉진하고 결과적으로 세포의 팽화를 일으킨다 (Gabbay and O'Sullivan, 1968; Dvornik *et al.*, 1973). 이 팽화는 수정체 섬유세포의 투과성을 항진하고, Na^+ , Cl 의 유입과 K^+ , 아미노산, 펩티드, ATP, myo-inositol 등의 유출을 일으킨다. 특히, Na^+ 이나 K^+ 등의 전해질의 평형과파괴에 의해 삼투압은 더 증가하고, 세포의 팽화를 촉진하여 세포막은 정상을 유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포 내 단백질 변성이 증가하여 수정체의 혼탁을 야기하게 되는데, 이와 같이 수정체가 혼탁해져 나타나는 백내장 증상을 당뇨병 합병증 진행과정의 한 지표로 사용한다. 따라서 polyol pathway 의 주요효소인 알도즈 환원효소를 억제하는 물질은 솔비톨의 생성과 축적을 억제함으로써 당뇨병 백내장의 발병을 억제하는 것이 가능하다고 알려져 있다. 실제로, 많은 보고에 의하면, *in vitro* 실험에서 알도즈 환원효소를 억제하는 성분이 당뇨병 백내장의 실험모델인 galactosemic rats 에서 백내장의 형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Verma and Kinoshit, 1976; Parmar and Ghosh, 1979).

당뇨병에서 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway 의 이상 이외에 혈중의 과량의 당과 단백질과의 결합에 의한 단백질 glycation 이 있다.

정상상태에서 일어나는 환원당의 carbonyl group 과 단백질의 amino group 간의 비효소적인 Millard 반응에 의해 Schiff base 가 형성되는데, 이 반응은 가역적이며 수시간에 걸쳐 일어난다. 그러나 고혈당 상태가 지속되면 Schiff base 는 수일간에 걸쳐 비가역적이며 더 안정한 구조인 초기당화산물 (Amadori products)로 재배열 (rearrangement)된다. 이 후 그들은 결국 탈수, 축합, 분열, 산화와 고리화 반응을 거쳐 더욱 재배열 (rearrangement)을 겪으면서 매우 안정하며 비가역적인 화합물을 발생시키며 이를 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGEs)이라 한다.

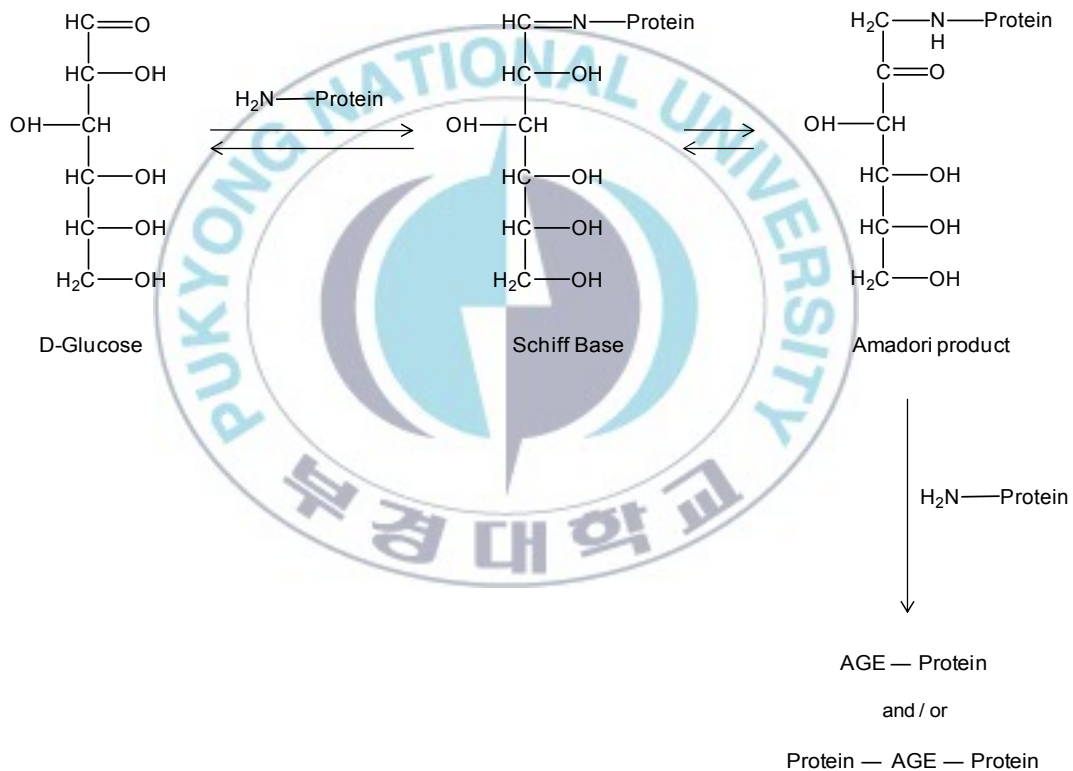


Fig. 1. Formation of advanced glycation endproducts

이렇게 형성된 최종당화산물은 혈당이 정상으로 회복된 이후에도 분해되지 않고 수명이 다 할 때까지 혈청알부민 (serum albumin), 수정체 (lens crystalline), 세포 외 세포간질의 collagen 과 같은 수명이 긴 단백질과 교차결합(cross-link)하여 심각한 당뇨합병증 (e.g., Atherosclerosis, Retinopathy, Nephropathy)을 유발하고 (Bucala *et al.*, 1995), Alzheimer's disease 나 Parkinson disease 와 같은 신경 퇴화성 질환, 염증반응과도 관련되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Grillo and Colombatto, 2008). 당뇨병 환자에게서 나타나는 동맥경화증은 증가된 혈당으로 인해 생성된 최종당화산물이 LDL 과 교차 결합하여 혈관벽에 축적되고, 대식세포나 내피세포 등의 수용체와의 결합을 통한 세포 활성화로 인해 유발되는 것으로 보고되고 있으며 (Vlassara, 1997), 혈청과 조직에서의 최종당화산물 수준의 증가는 심각한 신장기능의 손상을 야기하는 것으로 밝혀졌다 (Makita *et al.*, 1991). 또한, Smith 등 (Smith *et al.*, 1996)은 Alzheimer's disease 에서 최종당화산물은 amyloid β -peptide ($A\beta$)와 교차 결합하여 $A\beta$ fibril 의 형성에 기여하고, $A\beta$ plaque 의 불용해성을 증가시킨다고 보고하였다. Alzheimer's disease 환자의 뇌로부터 분리한 MAP-tau (microtubuli-associated protein tau)는 tubulin 결합부위가 당화되어 있으며, 당화된 MAP-tau 는 microtubules 과의 결합이 억제됨으로써 신경전달분자의 수송에 문제를 발생시킨다 (González *et al.*, 1998; Ledesma *et al.*, 1998). 더욱이, Mattson 등 (Mattson *et al.*, 1995)에 따르면 활성산소종 (ROS)은 이러한 당화과정에 기여하며, $A\beta$ 의 교차결합을 촉진시킨다고 한다. 최종당화산물은 특정 세포수용체와 결합하여 작용하는데 이 중 가장 잘 알려진 것이 AGE 수용체

(RAGE)이다 (Neeper *et al.*, 1992; Brett *et al.*, 1993). AGE-RAGE 상호작용에 의해 세포 내에서 p21ras 와 MAPK (mitogen-activated protein kinase)와 연관된 전달경로가 증폭되어 NF- κ B 의 활성화가 유도되고 이로 인해 proinflammatory factors 의 전사가 야기되어 염증반응이 일어난다 (Lander *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1994). 현재까지 많은 화합물들의 항당화 효과에 대한 연구가 진행되고 있으며, 알려진 최종당화산물 억제제로는 aspirin, aminoguanidine, phenacylthiazolium bromide 와 항산화제 등이 있다. 그 중 아미노구아니딘 (aminoguanidine)은 Amadori product 와 결합하여 단백질과의 교차결합을 억제한다고 알려져 있다 (Edelstein and Browmalee, 1992). 그러나 당뇨병성 신경장애 환자를 대상으로 한 임상 III상 연구에서 독성이 나타나 개발이 중단되었다 (Rahbar and Figarola, 2003). 이에 보다 안전하고 우수한 효능을 지닌 천연물에서의 생리활성물질의 분리·정제에 많은 연구자들의 관심이 집중되고 있다 (Corns, 2003; Tapsell *et al.*, 2006).

본 연구에서 사용된 갈조류인 다시마 (*Laminaria japonica* Areschoung, Sea tangle, Kombu)는 Laminariaceae 에 속하며, 한대·아한대의 연안에 분포하는 한해성(寒海性) 식물로 한국, 일본, 중국, 프랑스 등지에 분포한다. 예부터 식용으로 널리 이용되었으며, 한국에서는 임산부의 건강을 증진시키기 위한 전통치료약으로 사용되었다. 한의학에서는 다시마를 곤포 (昆布)라고 칭하며, 맛이 짜고 성질이 차고 독이 없는 것으로 알려져 있다. 동의보감(東醫寶鑑)에 따르면, 다시마는 12 가지의 수종을 치료하고, 소변을 잘 내보내며 얼굴이 부은 것을 내리게 한다고 하였으며, 본초경소론에서는

‘곤포’라 하여 뭉친 것을 풀어주고 응어리진 것을 헤쳐주며, 체내에 형성된 열 기운을 다스린다고 기록하고 있다. 또한, 고려도경 (高麗圖經)에서는 귀천을 막론하고 모두가 즐기는 입맛 돋우는 음식으로 소개하고 있다. 이전의 연구들에서 다시마의 메탄올 추출물의 free radicals 소거 활성효과 (Han *et al.*, 2002)와 항 돌연변이 활성 (Okai *et al.*, 1993)이 밝혀졌으며, 당뇨병 쥐에서 혈당을 낮추는 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 (Lee *et al.*, 1999). 그리고 streptozotocin 으로 유도된 쥐의 간에서 산화적 스트레스와 xanthine oxidase 활성에 대한 다시마 열수추출물의 예방효과 (Jin *et al.*, 2004)와 고혈당으로 유도된 산화적 스트레스에 대해 BuOH 분획물의 보호효과가 검증되었다 (Park *et al.*, 2006). 또한, 다시마로부터 분리된 라미나린 (laminarine), 알긴산 (alginic acid), 후코이단 (fucoidan)은 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다.

라미나린은 혈압조절 효과를 지니며 (Chiu and Fung, 1997), 알긴산은 식품첨가물로 널리 이용되고 있으며 (Critchley, 1993), 장내에 존재하는 유해한 미생물의 증식을 억제한다 (Hidaka *et al.*, 1986). 또한, 혈중 콜레스테롤을 저하시키며 (Kim *et al.*, 2000), 혈당조절 작용을 하는 것으로 보고되었다 (Lee *et al.*, 1996). 다당류인 후코이단은 혈액응고 억제활성 (Collicet *et al.*, 1991; Nishino *et al.*, 1989), 항 바이러스 효과 (Li *et al.*, 1995), 항암효과 (Song *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000), 면역조절 활성 (Wang *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2004), 항산화 효과 (Li *et al.*, 2002), 혈중지질 강하작용 (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001), 항보체 활성 (Zvyagintseva *et al.*, 2002), 위 보호작용 (Shibata *et al.*, 2000), 신장질환과 요로질환 완화 효과 (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005)등의 생리활성에 대한

다양한 연구들이 진행되어왔다. 이와 같이 다시마와 그로부터 분리된 성분들의 다양한 생리활성에 대한 많은 연구들이 보고 되어 왔으며, 추출물과 분획물 수준에서의 혈당 강하에 대한 연구가 발표된 바 있으나 다시마로부터 분리된 생리활성성분의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물 형성억제 활성의 검색을 통한 당뇨병과 당뇨합병증의 치료에 대해서는 연구된 적이 없다.

따라서, 본 연구에서는 다시마의 100% MeOH 추출물과 이를 계통적 분획법에 따라 분획하여 얻은 분획물들에 대한 lens aldose reductase 억제활성법, 최종당화산물형성 억제활성법을 *in vitro*에서 수행하고, 이들 중 활성을 지닌 분획물에 대해 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 생리활성물질을 분리 동정하였다. 이후, CH₂Cl₂ 분획물로부터 분리한 화합물을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR등의 분광학적 분석을 통하여 pheophorbide a와 pheophytin a로 동정하고, 이들의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물 형성억제 활성을 측정하여 당뇨합병증의 치료·예방효과를 측정하였다. 또한, HPLC-UV detector system을 이용한 동시분석법을 통해 추출용매를 달리하여 얻은 각각의 추출물 내의 pheophorbide a와 pheophytin a를 정량함으로써 최적의 추출조건을 확립하고자 하였다. 본 연구는 다시마와 다시마로부터 처음으로 분리한 porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물형성 억제활성을 통해 검증된 당뇨합병증에 대한 예방·치료 효과에 대한 첫번째 보고로써, 다시마가 당뇨와 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 기능성 식품으로 이용될 수 있음을 제시하고자 하였다.

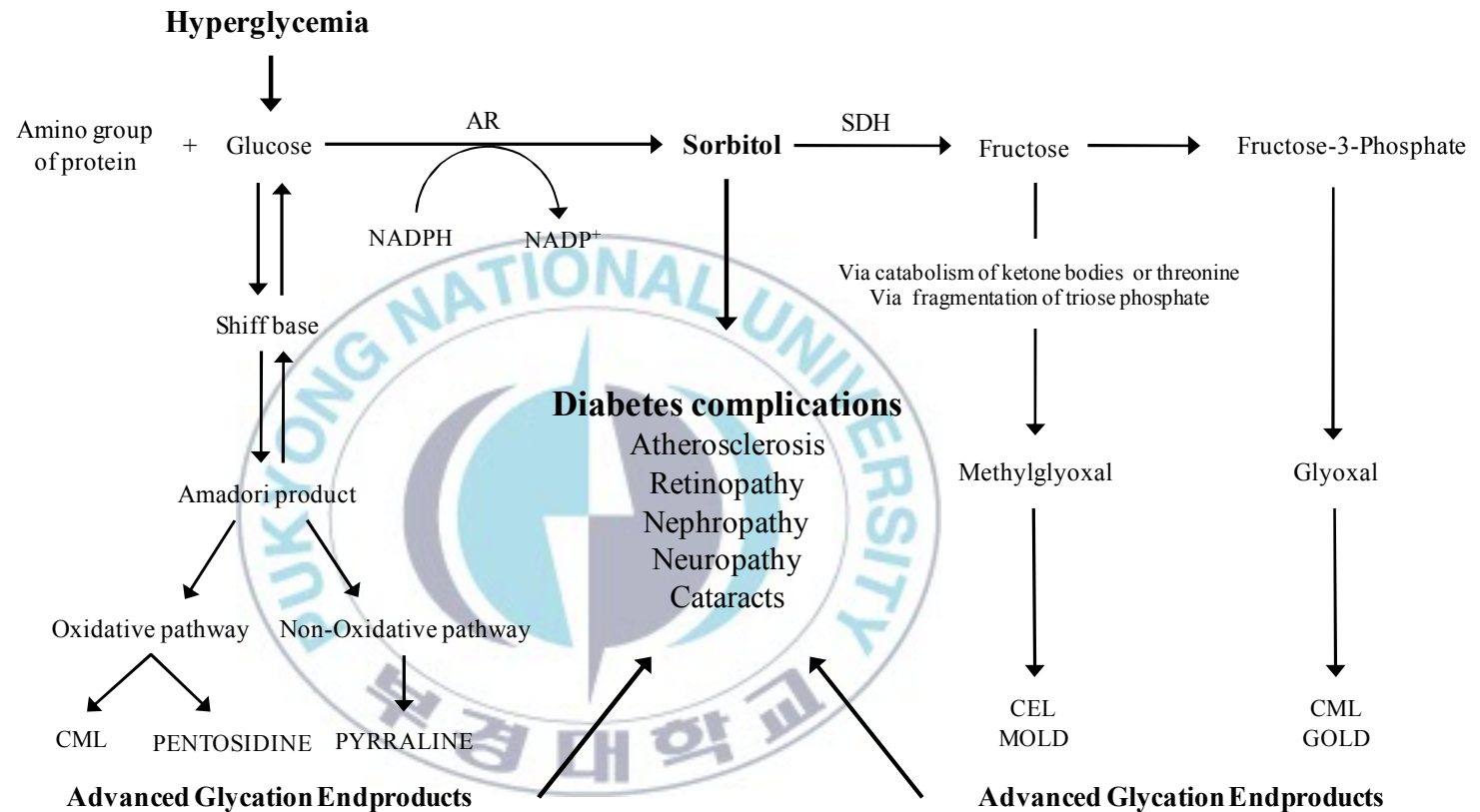


Fig. 2. Polyol pathway and AGEs formation in hyperglycemia. AR : aldose reductase; SDH : sorbitol dehydrogenase; CML : Nε-carboxymethyllysine; CEL : Nε-carboxyethyllysine; MOLD : methylglyoxal-derived lysine dimer; GOLD : Glyoxal-derived lysine dimer.

II. 실험 방법

1. 재료

본 실험에서는 2009년 5월에 기장물산(주)를 통하여 기장 연근해에서 채취하여 건조 발에 규격대로 낸 후 자연상태로 태양 건조한 다시마 (*Laminaria japonica*)를 구입하였다. 표본은 본 연구실에 보관하고 있다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Column packing material은 silica gel 60 (70~230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany), Lichroprep® RP-18 (40~63 μm , Merck)과 Diaion HP-20 (250~850 μm , Sigma)을 사용하였다. Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.25 mm, precoated Merck, Art. 5715)와 RP-18 F_{254s} (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H₂SO₄를 사용하였다. 추출 및 column chromatography는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)이다.

Bovine serum albumin (BSA), aminoguanidine, D-(-)-fructose, D-(+)-glucose, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), quercetin, DL-glyceraldehyde dimer, dimethyl sulfoxide (DMSO), chlorophyll a, protoporphyrin IX, hemin 과 hematin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, sodium

azide는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. HPLC 분석용 MeOH와 acetone은 각각 Merck KGaA (Darmstadt, Germany) 와 DUKSAN PURE CHEMICAL CO., LTD (Ansan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 과 NaOH는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan), Na_2HPO_4 는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

2-2. 기기

^1H -NMR과 ^{13}C -NMR은 JUN ECP-400 spectrometer (JEOL, Japan)로 각각 400 MHz와 100 MHz에서 측정하였다. 최종당화산물 측정은 microplate fluorescence reader FLx800 (Bio-Tek instruments, Inc., Winooski, USA)로 하였으며, lens aldose reductase 억제활성에서의 흡광도는 UV spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다. TLC상의 화합물은 장파장 (356 nm)과 단파장 (254 nm)검용 (Model ENT-240C, Spectroline, USA)를 사용하여 검색하였다.

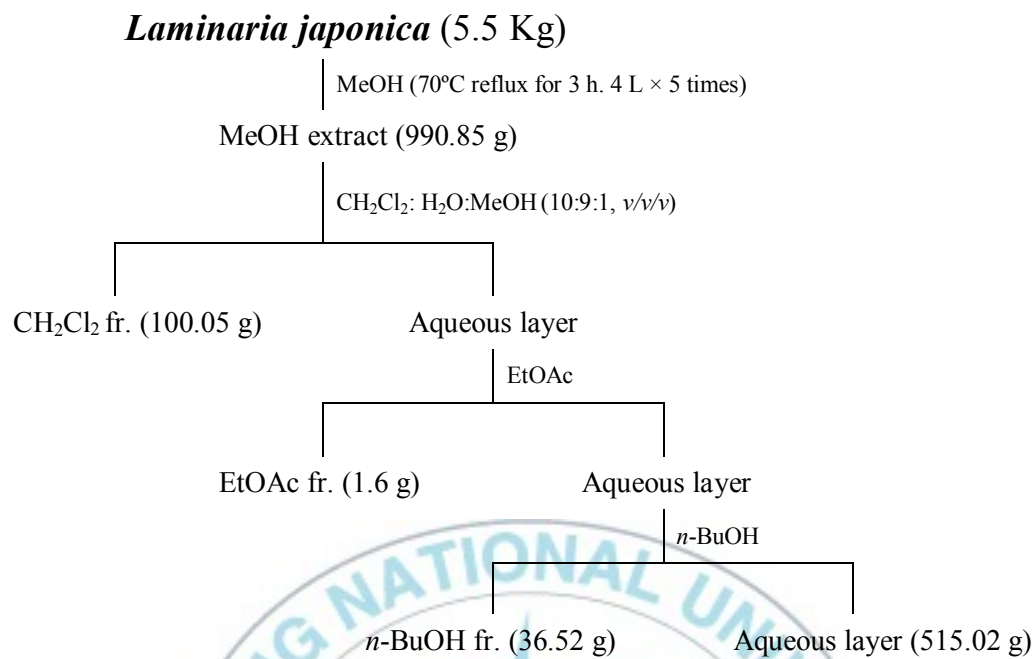
3. 실험방법

3-1. 추출 및 분획

건조분말상태의 다시마 (*Laminaria japonica*) 5.5 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 4 L의 MeOH로 70°C 수욕상에서 3시간씩 5회 추출하였다. 그리고 추출액을 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 990.85 g의

MeOH 추출물을 얻었다. 그 후 MeOH 추출물을 H₂O:MeOH (9:1, v/v)로 녹인 다음 분액 깔대기에 붓고, 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 분획하였다. 평형화된 아래층의 CH₂Cl₂ 가용부는 무수 망초 (sodium sulfate, anhydrous)를 처리한 후 여과하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH₂Cl₂ 분획물 100.05 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 1.6 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 분획물 36.52 g과 하층의 H₂O 분획물 515.02 g을 얻었다 (Scheme 1).





Scheme 1. Extraction and fractionation of *Laminaria japonica*

3-2. 화합물의 분리

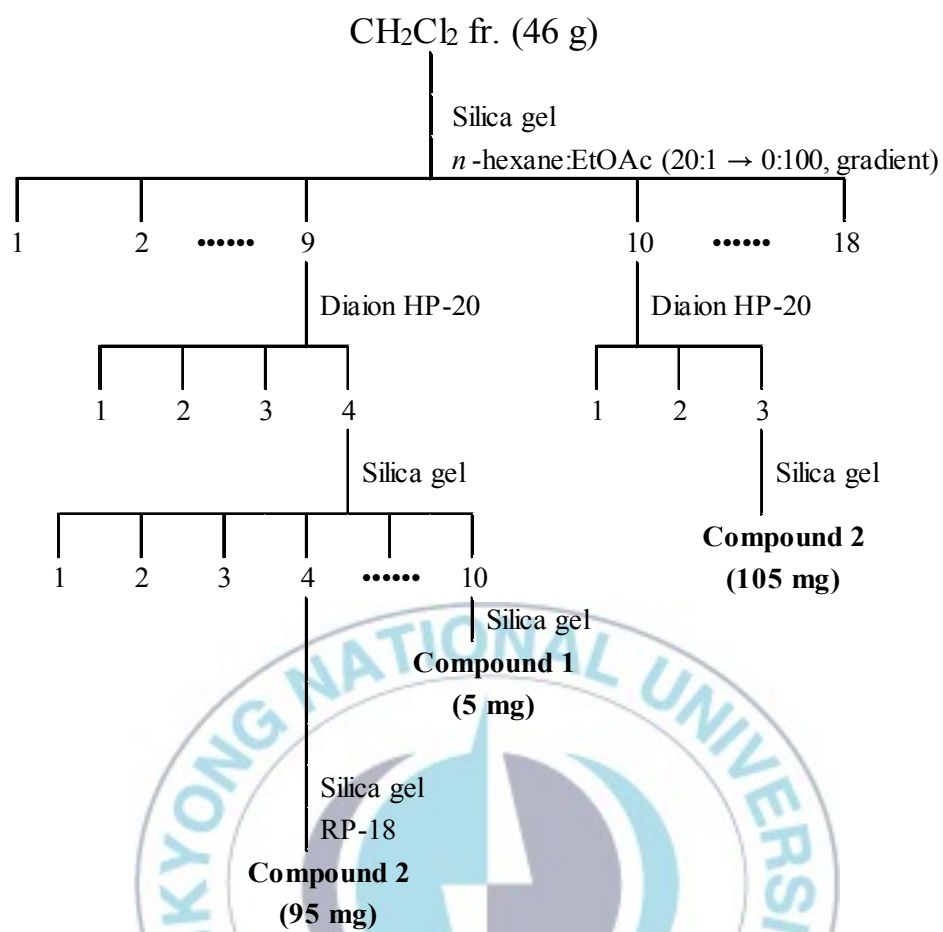
3-2-1. CH₂Cl₂ 획분의 성분 분리

다시마 (*Laminaria japonica*)의 MeOH 추출물과 그 분획물들에 대하여 최종당화산물 형성 억제활성법과 lens aldose reductase 억제활성실험법을 시행한 결과, EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 CH₂Cl₂ 분획물이 높은 억제활성이 나타냈다. 그러나 CH₂Cl₂ 분획물이 EtOAc 분획물보다 다소 낮은 억제활성을 나타내지만, Scheme 1에서 볼 수 있듯이 CH₂Cl₂ 분획물이 EtOAc 분획물보다 수율이 높기 때문에 상대적으로 활성성분이 다량 함유되어 있을 것으로 예상된다. 이에 CH₂Cl₂ 분획물을 대상으로 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성성분을 분리하였다. CH₂Cl₂ 분획물 (46 g)을 *n*-hexane:EtOAc (20:1 ~ 0:100)의 용매로 silica gel column chromatography하여 18개의 subfractions (F1 ~ F18)으로 나누었다 (Scheme 2).

이들 subfractions으로 최종당화산물 억제활성을 검색해본 결과, F9, F10, F13, F14에서 높은 활성을 보였다. 이에 각각의 subfractions의 양을 고려하여 F9, F10을 column chromatography하였다. F9 (2.3 g)을 전개용매 EtOH, MeOH 과 acetone으로 Diaion HP-20 column chromatography한 후 acetone subfraction (F9-4)을 *n*-hexane:acetone (10:1 ~ acetone, gradient)으로 silicagel column chromatography하여 10개의 subfractions (F9-4-1 ~ F9-4-10)을 얻었으며, compound 1 (pheophorbide a, 5 mg)을 얻었다. 이 후 F9-4-3 subfraction을 Lichroprep[®] RP-18 (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O

=8:22:1)로 정제하여 compound **2** (pheophytin a, 95 mg)을 분리하였다. 동일한 분리방법으로 F10 (1.9 g)에서도 pheophytin a (105 mg)를 얻었다.





Scheme 2. Isolation of compounds **1** and **2** from CH₂Cl₂ fraction of *Laminaria japonica*

3-2-2. CH₂Cl₂ 분획물에서 분리된 성분의 분광학적 성질

화학적 이동 (Chemical shift)은 내부표준물질로 tetramethylsilane (TMS)을 기준으로 하여 ppm단위로 나타내었다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR의 다중도 (multiplicities)는 각각 s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), brd (broad doublet), t (triplet) 그리고 m (multiplet), q (quartet)으로 표시하였다.

Compound 1 (Pheophorbide a): a Dark green amorphous solid. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.42 (s, 10-H), 9.25 (s, 5-H), 8.53 (s, 20-H), 7.90 (dd, *J*=18, 12 Hz, 3¹-H), 6.13 (d, *J*=11 Hz, 3²-H), 6.23 (s, 13²-H), 4.19 (brd, *J*=8 Hz, 17-H), 4.43 (q, *J*=9 Hz, 18-H), 3.63 (q, *J*=9 Hz, 8¹-CH₂), 3.55 (s, 12¹-Me), 3.34 (s, 2¹-Me), 3.13 (s, 7¹-Me), 3.85 (s, 13²-CO₂Me), 2.58 (m, 17¹-CH₂), 2.24 (m, 17²-CH₂), 1.63 (t, *J*=8 Hz, 8²-Me), 1.81 (d, *J*=7 Hz, 18¹-Me), 0.00 (NH). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 11.1 (C-7¹), 12.0 (C-2¹), 12.0 (C-12¹), 17.3 (C-8²), 19.3 (C-8¹), 23.0 (C-18¹), 29.5 (C-17²), 30.7 (C-17¹), 50.0 (C-18), 50.9 (C-17), 52.8 (C-13², CO₂Me), 64.6 (C-13²), 93.0 (C-20), 97.4 (C-5), 104.3 (C-10), 105.0 (C-15), 122.7 (C-3²), 128.8 (C-13), 128.9 (C-3¹), 128.9 (C-12), 131.8 (C-2), 136.0 (C-3), 136.2 (C-7), 136.4 (C-4), 137.8 (C-11), 142.0 (C-1), 145.1 (C-8), 149.5 (C-9), 150.8 (C-14), 155.5 (C-6), 161.0 (C-16), 169.6 (C-13², CO₂), 172.0 (C-19), 177.8 (C-17², CO₂), 189.6 (C-13¹) (Chee *et al.*, 2005).

Compound 2 (Pheophytin a): a Dark green amorphous solid. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.34 (s, 10-H), 9.16 (s, 5-H), 8.52 (s, 20-H), 7.82 (dd, $J=18$, 11.6 Hz, 3^1-H), 6.19 (dd, $J=11.6$, 1.6 Hz, 3^2-CH_2), 6.28 (s, 13^2-H), 4.23 (brd, $J=9$ Hz, 17-H), 4.49 (q, $J=8$ Hz, 18-H), 3.49 (q, $J=9$ Hz, 8^1-CH_2), 3.90 (s, 12^1-Me), 3.33 (s, 2^1-Me), 3.04 (s, 7^1-Me), 3.64 (s, 13^2-OMe), 2.50~2.64 (m, 17^1-C), 2.21~2.36 (m, 17^2-C), 1.49 (t, $J=8$ Hz, 8^2-Me), 1.82 (d, $J=8$ Hz, 18^1-Me). Phytol group: 5.16 (t, $J=6.5$ Hz, P2-H), 4.44 (dd, $J=12.9$, 6.5 Hz, P1-H), 1.88 (m, P4-C), 1.59 (s, P17-Me), 0.9~1.3 (m, P5~P14-C), 0.85 (m, P18, P19-CH₃), 0.79 (P16, P20-CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): 11.0 (C-7¹), 12.0 (C-2¹), 12.0 (C-12¹), 16.3 (C-P17), 17.3 (C-8²), 19.2 (C-8¹), 22.6 (C-P20), 22.7 (C-P16), 23.1 (C-18¹), 24.4 (C-P15), 24.7 (C-P9), 24.9 (C-P5), 27.9 (C-P13), 29.8 (C-17²), 31.2 (C-17¹), 32.6 (C-P11), 32.7 (C-P7), 36.6 (C-P14), 37.2 (C-P12), 37.3 (C-P10), 37.3 (C-P8), 39.3 (C-P6), 39.8 (C-P4), 50.1 (C-18), 51.1 (C-17), 52.8 (C-13², OMe), 61.5 (C-P1), 64.7 (C-13²), 93.0 (C-20), 97.3 (C-5), 104.2 (C-10), 105.2 (C-15), 117.7 (C-P2), 122.6 (C-3²), 128.8 (C-13), 128.8 (C-3¹), 128.9 (C-12), 131.8 (C-2), , 135.9 (C-7), 136.0 (C-3), 136.3 (C-4), 137.8 (C-11), 141.9 (C-1), 142.8 (C-P3), 145.0 (C-8), 150.8 (C-9), 149.6 (C-14), 155.4 (C-6), 161.2 (C-16), 172.9 (C-13², OH), 172.1 (C-19), 172.9 (C-17², CO₂), 189.6 (C-13¹). (Lawson *et al.*, 1989, Hargus *et al.*, 2007, Wanga *et al.*, 2009, Sobolev *et al.*, 2005, Egorova-Zachernyuk *et al.*, 1997).

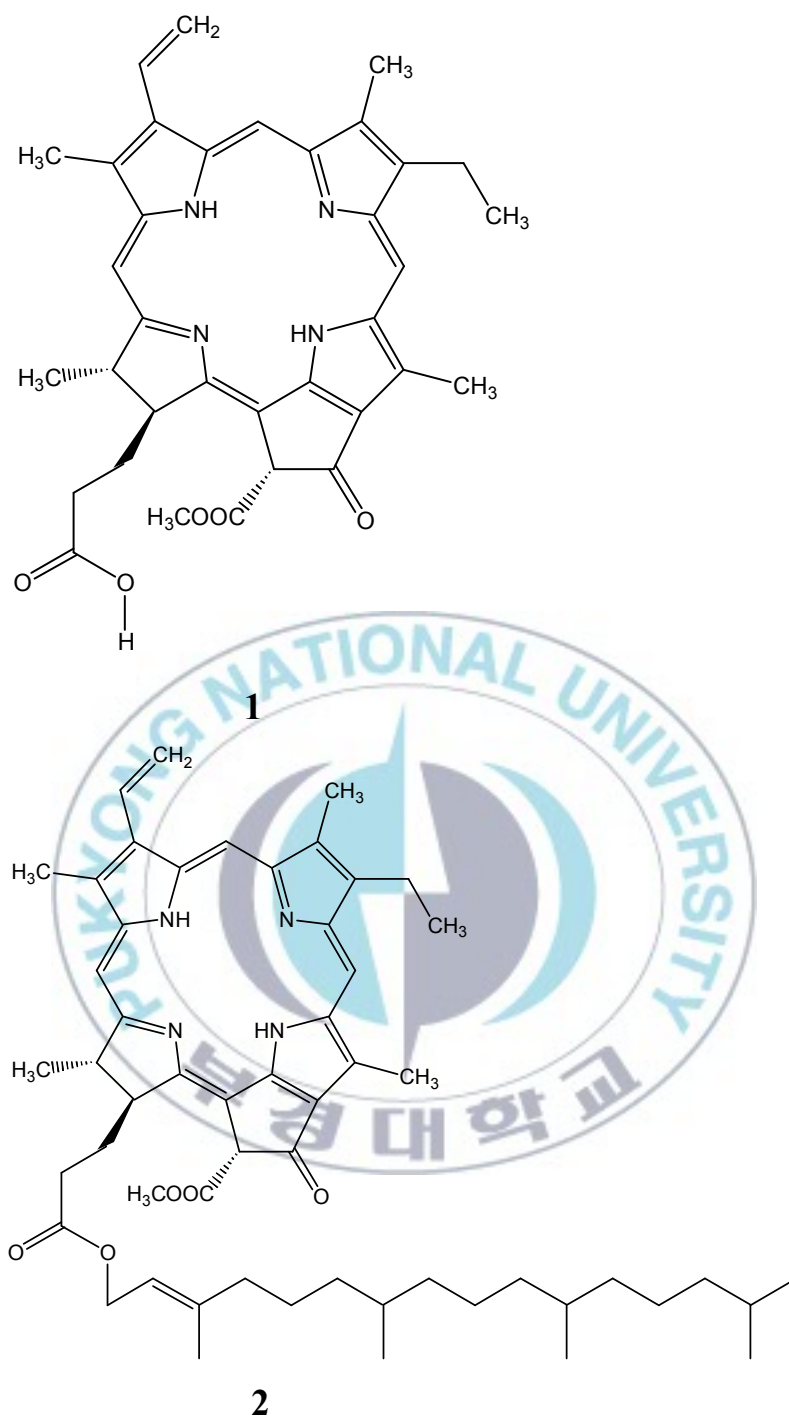


Fig. 3. Structures of the compounds **1** and **2** isolated from *Laminaria japonica*

3-3. 항당뇨 합병증 실험

3-3-1. 최종당화산물 형성 억제활성 실험

최종당화산물 형성 억제활성은 Vinson and Howard (1996)의 방법을 변형하여 실험하였다. 0.2 M glucose, 0.2 M fructose 와 bacteria의 성장을 막기 위한 0.02% sodium azide를 50 mM sodium phosphate buffer에 녹인 후, 10 mg/mL bovine serum albumin을 첨가한다. AGE reaction solution 950 μ L과 10% DMSO에 녹인 여러 농도의 sample 50 μ L를 섞은 후, 37°C에서 7일간 incubation한다. 이후 spectrofluorometric detector (FLx800 microplate fluorescence reader, Bio-Tek Instrument, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 350 nm (excitation wavelengths)와 450 nm (emission wavelengths)에서 반응생성물의 fluorescence intensity를 측정하였다 (Scheme 3). Positive control로는 aminoguanidine hydrochloride을 사용하였으며, AGEs 형성 억제율은 아래의 식을 통하여 구한 후, 선회귀방정식을 이용하여 통계처리 하였다.

$$\% \text{ 억제율} = 1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{표준흡광도} \times 100$$

Reaction solution preparation

0.2 M glucose + 0.2 M fructose + 0.02% sodium azide + BSA



Reaction solution 950 μ L + Sample 50 μ L



Incubation 37°C, 7 days



Measurement at

Excitation wavelength at 350 nm

Emission wavelength at 450 nm

Scheme 3. Assay of AGE formation inhibitory activity

3-3-2. Lens aldose reductase 억제 활성 실험

Lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman과 Kinoshita (1965)의 방법을 수정하여 실시하였다. 흰쥐의 수정체를 적출하고 수정체 1개당 0.5 mL의 phosphate buffer을 가하여 균질화한다. 이를 4°C, 10,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 사용한다. 반응 buffer인 potassium phosphate buffer (pH 7.0) 620 µL, 효소원 90 µL, NADPH(1.6 mM) 90 µL, DMSO에 녹인 MeOH extract, 각각의 fractions과 compounds 9 µL, 기질로는 90 µL의 DL-glyceraldehyde를 큐벳에 넣어 UV spectrophotometer (Ultrospec® 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료대신 DMSO를 첨가하여 측정하며, 저해율은 다음의 식으로 구하였다 (Scheme 4).

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 4\text{분 흡광도}) / 4 (\text{측정시간})\} \times 100$$

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

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 µg/ml 혹은 µM로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.

Rat lens homogenization in sodium phosphate buffer (pH 6.2)



Centrifugation at 10,000 rpm and 4°C for 20 min



Supernatant (enzyme preparation)



Sample 9 μL + enzyme 90 μL



NADPH 90 μL



DL-glyceraldehyde 90 μL



Potassium phosphate buffer 620 μL



Measurement at 340 nm, Duration 4 min, perion 30 s

Scheme 4. Assay of rat lens aldose reductase inhibitory activity

3-4. HPLC 분석

3-4-1. 표준용액 제조 및 검량곡선

Pheophorbide a와 pheophytin a를 정확히 칭량하고 HPLC 분석용 acetone를 가하여 1 mg/ml이 되도록 조제한 후, 실험에 알맞은 농도로 희석하였다. Pheophorbide a는 31.25 µg/ml ~ 1.95 µg/ml의 농도범위에서, pheophytin a는 125.0 µg/ml ~ 7.8 µg/ml의 농도범위에서 각각 검량곡선을 작성하였다.

3-4-2. 시료 준비

분말 형태의 다시마를 0.1 g씩 취하여 10 mL의 acetone과 MeOH 그리고 CH₂Cl₂을 첨가한 다음 초음파세척기에서 30분간 추출하였다. 이를 4°C에서 3시간 동안 방치한 후, 원심분리기를 이용하여 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 그 상층액을 분리하였다. 위와 같은 방법으로 2회 반복하여 얻은 상층액을 4°C에서 12시간 방치한 후, 용매는 농축기를 이용하여 제거하고 HPLC 분석용 acetone으로 녹여 실험하였다.

3-4-3. HPLC 분석 조건

본 연구에서는 PU-1580 intelligent HPLC pump, LG-2580-04 quaternary gradient unit, UV/Vis detector, PG-1580-54 4-line degasser 그리고 CO-1560 intelligent column thermostat로 구성된 JASCO HPLC system을 이용하여 HPLC 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 column은 ODS Hypersil, (5 µm 4.6 mm I.D. × 250 mm)으로 flow

rate 0.8 ml/min에서 진행하였다. HPLC 분석 시 측정 파장은 410 nm에서 측정하였으며, solvent system 구성은 (A) methanol:0.5 M ammonium acetate (80:20), (B) methanol:acetone (70:30)이며, gradient는 100% A에서 시작하여 5분간 linear flow로 75% A:25% B로 진행 후, 5분간 linear flow로 50% A:50% B까지 진행한다. 이후, 5분간 linear flow로 25% A:75% B로 진행하고 20분간 linear flow로 100% B까지 진행한다. 그리고 isocratic flow로 10분간 진행한 후, 5분간 linear flow로 100% A까지 진행한다. 시료는 20 μ L를 주입한다.



Table 1. HPLC analytical condition of pheophorbide a and pheophytin a

Column	ODS Hypersil, (5 μ m 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm)		
Flow rate	0.8 ml/min		
Detector	410 nm		
Injection vol.	20 μ l		
Mobile phase	(A) methanol:0.5 M ammonium acetate (80:20)		
	(B) methanol:acetone (70:30)		
Gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	100	0
	5	75	25
	10	50	50
	15	25	75
	35	0	100
	45	0	100
	50	100	0
	60	100	0

III. 결과 및 고찰

1. 다시마 CH_2Cl_2 분획물에서 분리된 화합물의 구조결정

다시마 (*Laminaria japonica*)의 분획물 중 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성이 높으면서도 수율이 높은 CH_2Cl_2 분획물에서 column chromatography를 통하여 2종의 화합물을 분리·정제 하였으며 1D NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)의 분광학적 방법을 사용하여 분석하였다. 이들 화합물은 다시마에서는 처음 분리된 화합물이다.

Compound 1 (pheophorbide a)는 암녹색의 비결정성 고체로 분리되었으며, 용매는 CDCl_3 로 ^1H -NMR (Fig. 4)과 ^{13}C -NMR (Fig. 5) spectrum을 측정하고 그 data를 문헌치 (Chee *et al.*, 2005)와 비교하여 pheophorbide a임을 확인하였다. 이 화합물은 *Scutellaria barbata*, *Ficus macrocarpa* 등으로부터 분리되었으며, 항산화 활성 (Hsu *et al.*, 2005)과 간암세포에 대한 광역학적 치료효과 (Tang *et al.*, 2006)를 가지는 것으로 보고 되었다. 또한, 피부암의 일종인 색소성 흑색종 (Lim *et al.*, 2004), 결장암 (Hajri *et al.*, 2002)과 췌장암 세포 (Hajri *et al.*, 1999)등의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며, ICR 마우스의 피부에서 항암효과와 항 염증효과를 지니는 것으로 밝혀졌다 (Nakamura *et al.*, 1996).

Compound 2 (pheophytin a)는 암녹색의 비결정성 고체로 분리되었으며, 용매는 CDCl_3 를 사용하여 ^1H -NMR (Fig. 6)과 ^{13}C -NMR (Fig. 7) spectrum을

측정하였다. 그 결과, 문헌치 (Lawson *et al.*, 1989; Hargus *et al.*, 2007; Wanga *et al.*, 2009; Sobolev *et al.*, 2005; Egorova-Zachernyuk *et al.*, 1997)의 spectrum과 일치하여 pheophytin a로 동정하였다. 이 화합물은 *Lonicera hypoglauca*, *Sargassum fulvellum*, *Enteromorpha prolifera* 등으로부터 분리되었으며, 항 C형 간염효과 (Wanga *et al.*, 2009)와 PC12 cells의 분화를 증폭시킴으로써 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환에 대한 효과 (Ina *et al.*, 2007), 항산화 효과가 알려져 있다 (Higashi-Okai *et al.*, 2001). 또한, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도한 생쥐 포식세포에서 초과산화물 음이온 ($O_2^{\cdot-}$)의 생성을 억제하고, 생쥐 귀에서 부종과 같은 염증반응에 대해 강력한 억제효과를 가지는 것으로 밝혀졌다 (Okai and Higashi-Okai, 1997).



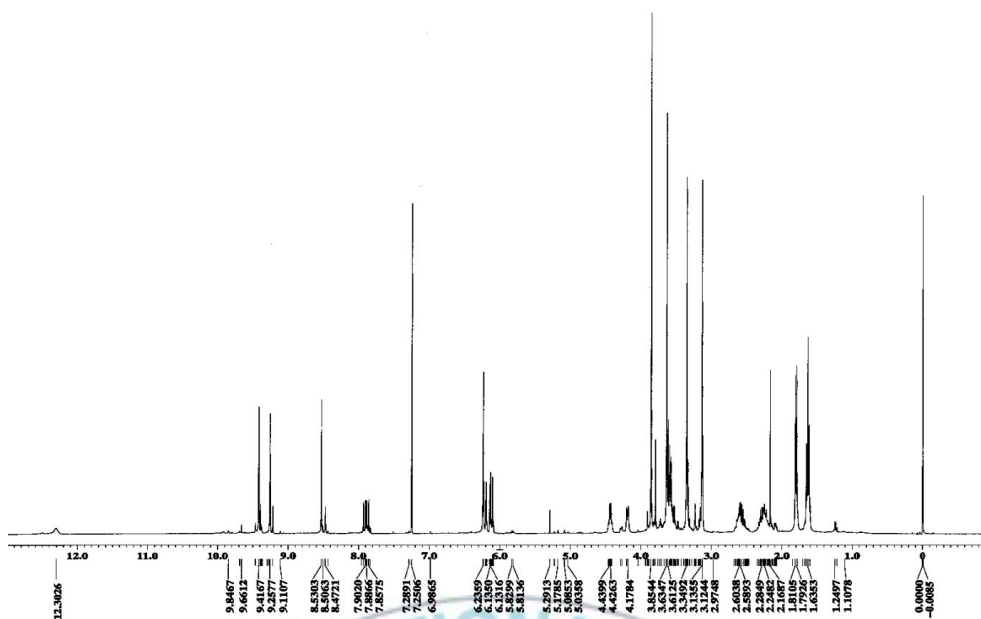


Fig. 4. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

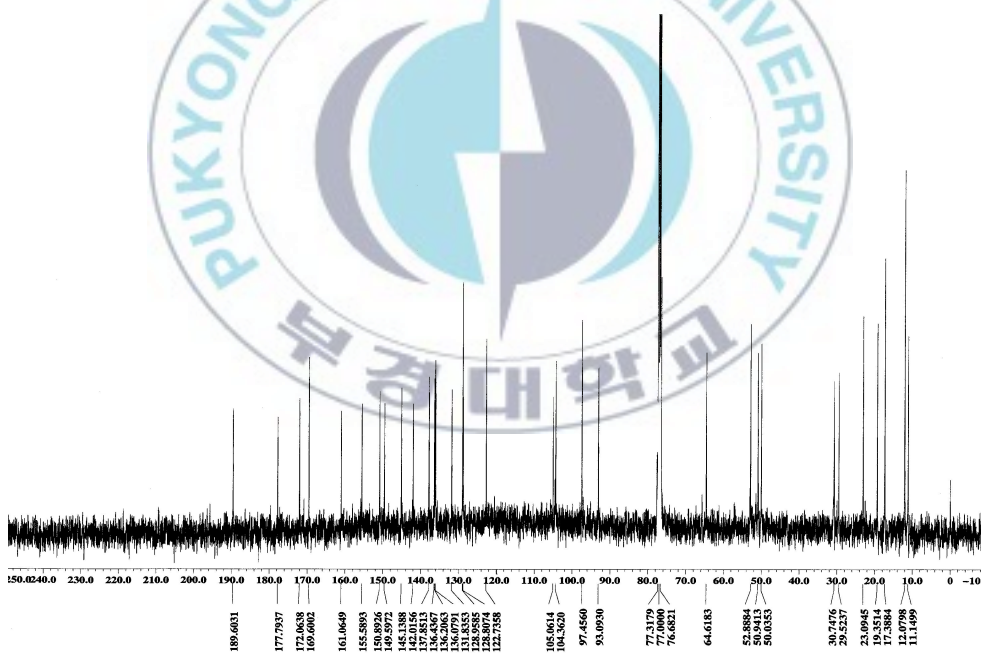


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

Table 2. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound **1** in CDCl_3

Positions	$^1\text{H}\delta$	$^{13}\text{C}\delta$
1		142.0
2		131.8
2 ¹	3.34 (s)	12.0
3		136.0
3 ¹	7.90 (dd, J=18,12)	128.9
3 ² -H	6.13 (d, J=11)	122.7
4		136.4
5	9.25(s)	97.4
6		155.5
7		136.2
7 ¹	3.13 (s)	11.1
8		145.1
8 ¹	3.63 (q, J=9)	19.3
8 ²	1.63(t, J=8)	17.3
9		149.5
10	9.42 (s)	104.3
11		137.8
12		128.9
12 ¹	3.55 (s)	12.0
13		128.8
13 ¹		189.6
13 ² -CO ₂ Me	3.85 (s)	52.8
13 ² -OH		169.6
13 ² -H	6.23 (s)	64.6
14		150.8
15		105.0
16		161.0
17	4.19(brd, J=8)	50.9
17 ¹	2.58, 2.60 (m)	30.7
17 ²	2.24, 2.28 (m)	29.5
17 ² -CO ₂		177.8
18	4.43 (q, J=9)	50.0
18 ¹	1.81 (d, J=7)	23.0
19		172.0
20	8.53(s)	93.0

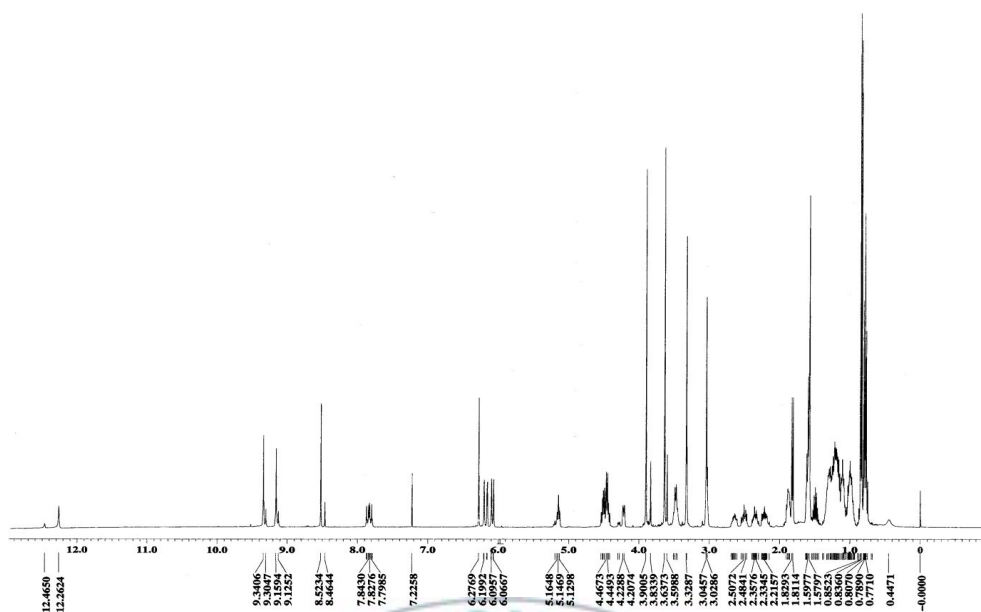


Fig. 6. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CDCl_3

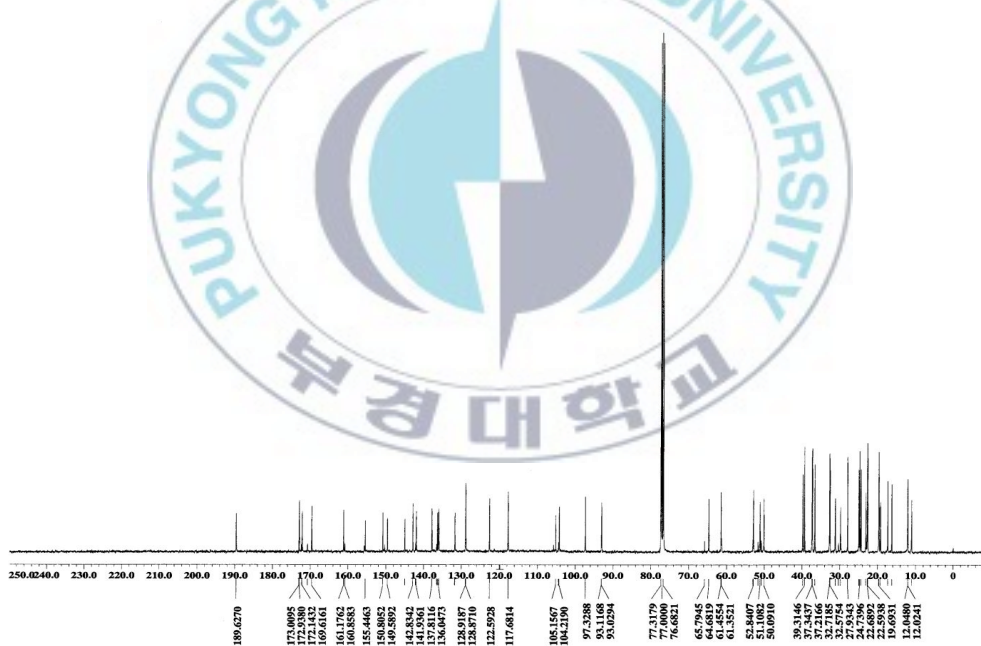


Fig. 7. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CDCl_3

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound **2** in CDCl_3

Positions	$^1\text{H}\delta$	$^{13}\text{C}\delta$	Positions	$^1\text{H}\delta$	$^{13}\text{C}\delta$
1		141.9	p1	4.44	61.5
2		131.8		(dd, J=12.9 6.5)	
2 ¹ -Me	3.33 (s)	12.0	p2-H	5.16 (t, J=6.5)	117.7
3		136.0	P3		142.8
3 ¹ -H	7.82	128.8	P4	1.88 (m)	39.8
	(dd, J=18, 11.6)		P5	0.9-1.3 (m)	24.9
3 ²	6.19	122.6	P6	0.9-1.3 (m)	39.3
	(dd, J=11.6, 1.6)		P7		32.7
4		136.3	P8	0.9-1.3 (m)	37.3
5-H	9.16(s)	97.3	P9	0.9-1.3 (m)	24.7
6		155.4	P10	0.9-1.3 (m)	37.3
7		135.9	P11		32.6
7 ¹ -Me	3.04 (s)	11.0	P12	0.9-1.3 (m)	37.2
8		145.0	P13	0.9-1.3 (m)	27.9
8 ¹	3.49 (q, J=9)	19.2	P14	0.9-1.3 (m)	36.6
8 ² -Me	1.49 (t, J=8)	17.3	P15		24.4
9		150.8	P16		22.7
10-H	9.34 (s)	104.2	P17	1.59 (s)	16.3
11		137.8	P18		16.3
12		128.9	P19		16.3
12 ¹ -Me	3.90 (s)	12.0	P20		22.6
13		128.8			
13 ¹		189.6			
13 ² -OH		172.9			
13 ² H	6.28 (s)	64.7			
13 ² -OMe	3.64 (s)	52.8			
14		149.6			
15		105.2			
16		161.2			
17-H	4.23 (brd, J=9)	51.1			
17 ¹	2.50-2.64 (m)	31.2			
17 ²	2.21-2.36 (m)	29.8			
17 ² -CO ₂		172.9			
18-H	4.49 (q, J=8)	50.1			
18 ¹ -Me	1.82(d, J=7.2)	23.1			
19		172.1			
20-H	8.52 (s)	93.0			

2. 생리활성실험

2-1. 항당뇨 합병증 실험

2-1-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성

다시마의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H₂O층의 최종당화산물 억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성을 측정하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다.

최종당화산물 억제활성법의 대조약물로는 aminoguanidine을 사용하였으며, 활성을 검색한 결과 다시마의 MeOH 추출물과 분획물들의 IC₅₀ 값은 EtOAc 분획물 (IC₅₀ 150.32 µg/ml) > CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀ 167.65 µg/ml) > MeOH 추출물 (IC₅₀ 1,206.08 µg/ml) > *n*-BuOH 분획물 (> IC₅₀ 1,600 µg/ml) > H₂O 분획물 (> IC₅₀ 1,600 µg/ml)의 순으로 나타났다. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성 억제활성 실험에서 *n*-BuOH 분획물과 H₂O층은 1,600 µg/ml 이상에서도 전혀 효과가 나타나지 않았다. 대조군인 aminoguanidine (IC₅₀ 86.77 µg/ml)보다는 다소 낮은 최종당화산물 형성 억제활성을 나타내었으나, MeOH 추출물과 각 분획물 들 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보이고, 다음으로 CH₂Cl₂ 분획물이 높은 활성을 나타내었다.

다시마의 MeOH 추출물과 분획물들의 lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위해 대조약물로는 aldose reductase 억제제로 알려져 있는 quercetin

(Varma *et al.*, 1975; Varma *et al.*, 1977; Leuenberger, 1978)을 사용하였다. 다시마의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 분획물들의 lens aldose reductase 억제활성은 100.0 µg/ml의 농도에서 EtOAc 분획물 ($50.83 \pm 0.12\%$) > *n*-BuOH 분획물 ($31.85 \pm 1.01\%$) > CH₂Cl₂ 분획물 ($30.24 \pm 0.36\%$) > MeOH 추출물 ($27.44 \pm 1.13\%$) > H₂O 분획물 ($19.11 \pm 1.34\%$)의 순으로 나타났다. 이들은 대조군인 quercetin (1.0 µg/ml의 농도에서 $65.89 \pm 0.95\%$)보다는 낮은 활성을 나타내었으나, 그 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 다음으로 *n*-BuOH 분획물과 CH₂Cl₂ 분획물이 높은 억제활성을 나타내었다

이들 결과를 종합해 보면, EtOAc 분획물이 두 실험계에서 가장 강력한 억제활성을 지니고 다음으로 CH₂Cl₂ 분획물이 효과적인 것을 알 수 있었다 (Fig. 8). 그러나 수율 면을 고려해볼 때, CH₂Cl₂ 분획물이 EtOAc 분획물의 63배 가량 높기 때문에 CH₂Cl₂ 분획물에 최종당화산물 형성과 lens aldose reductase 활성을 억제할 수 있는 성분이 다량 존재하고 있을 것으로 기대할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 CH₂Cl₂ 분획물에서 그 생리활성성분을 분리하고자 하였다.

Table 4. *In vitro* activities of methanolic extract and its fractions from *L. japonica* on RLAR and AGEs formation

Samples	RLAR ^a	AGE ^b
	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
	Mean ± S.E.M.	Mean ± S.E.M.
MeOH extract	27.44 ± 1.13	1206.08 ± 21.29
CH ₂ Cl ₂ fraction	30.24 ± 0.36	167.65 ± 1.76
EtOAc fraction	50.83 ± 0.12	150.32 ± 2.84
<i>n</i> -BuOH fraction	31.85 ± 1.01	>1600
H ₂ O fraction	19.11 ± 1.34	>1600
Quercetin ^c	65.89 ± 0.95	
Aminoguanidine ^d		86.77 ± 0.62

RLAR: rat lens aldose reductase; AGE: advanced glycation end products.

^aLens aldose reductase was determined at a concentration of 100.0 μg/ml for the methanolic extract and its fractions obtained from the methanolic extract of *L. japonica* dissolved in DMSO.

^bThe 50% inhibition concentration (μg/ml) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean ± S.E.M. of triplicate experiments. ^cQuercetin (1.0 μg/ml) was used as a positive control in the RLAR assay. ^dAminoguanidine was used as a positive control in the AGE assay.

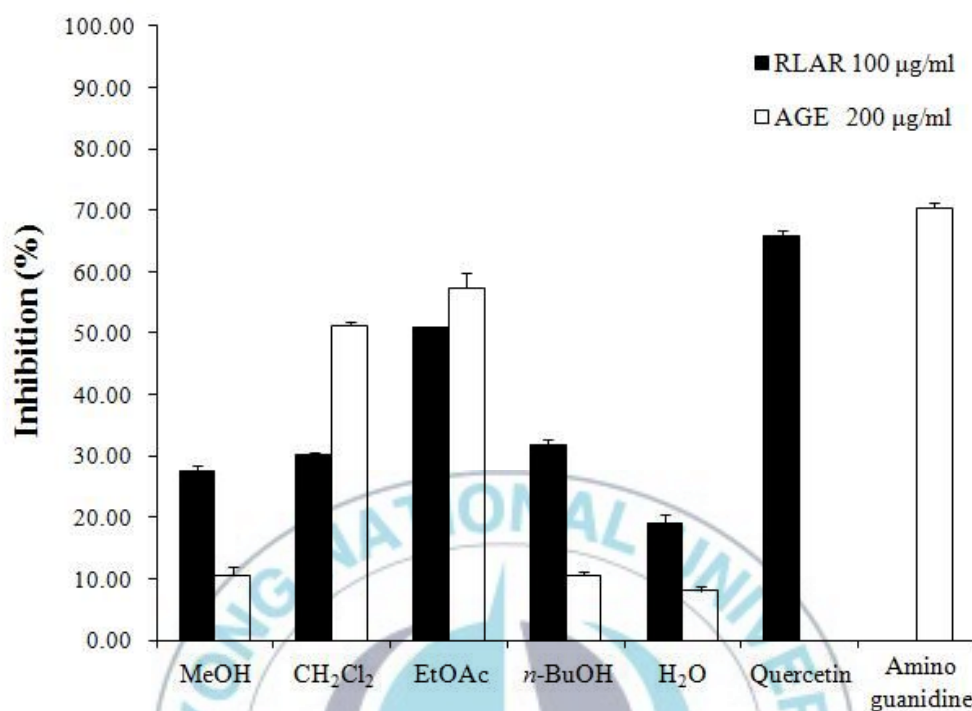


Fig. 8. *In vitro* activities of methanolic extract and its fractions from *L. japonica* on RLAR and AGEs formation

RLAR: rat lens aldose reductase; AGE: advanced glycation end products. RLAR and AGEs formation were determined at a concentration of 100.0 µg/ml and 200.0 µg/ml, respectively.

2-1-2. 분리된 화합물들의 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성

다시마의 CH_2Cl_2 분획물을 대상으로 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography 를 수행하여 2종의 porphyrin계 화합물인 pheophorbide a (1), pheophytin a (2)를 분리하였으며, 이들을 대상으로 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 평가하였다 (Table 5). 최종당화산물 형성 억제활성 실험은 *in vitro*에서 glucose, fructose와 같은 당과 BSA간의 당화반응에 의해 형성된 형광성을 지닌 최종당화산물의 측정을 통해 이루어졌다. 다시마에서 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a는 대조군인 aminoguanidin보다 강력한 억제활성이 나타났으며, pheophorbide a의 IC_{50} 값은 $42.06 \pm 1.03 \mu\text{M}$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin ($735.65 \pm 6.71 \mu\text{M}$)보다 약 15배정도 높은 활성을 보였다. pheophytin a의 $228.71 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin보다는 3배정도 강한 활성을 나타냈다.

고혈당 상태에서 생성된 free radicals에 의해 발생하는 당의 자동산화는 최종당화산물의 형성을 증폭시키는 것으로 알려져 있다 (Wolff *et al.*, 1991). 이전 연구에 따르면, *in vitro*에서 glucose와 albumin으로 부터의 최종당화산물의 형성은 albumin의 지질 일부분에 대한 free radicals의 작용에 기인한 것으로 밝혀졌다 (Le Guen *et al.*, 1992). 실제로, 강력한 항산화제로 알려진 vitamin E (α -tocopherol)가 항 당화물질로 작용한다는 연구가 발표된 바 있으며 (Ceriello *et al.*, 1988), 천연 dipeptide인 carnosine은 뇌와 근육에 있어 주요한 항산화제로서 이 또한 당과 단백질의 결합을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Boldyrev, 1990).

따라서, 이러한 항산화 활성을 지닌 생리활성물질들이 고혈당 상태에서 생성된 free radicals를 소거함으로써 최종당화산물의 형성을 억제한다고 볼 수 있다. Matsushita와 Iwami에 따르면, chlorophyll과 그 유도체의 기본적인 구조인 porphyrin ring은 10개 이상의 이중결합을 포함하고 있으며, 이 구조가 chlorophyll과 그 유도체가 지니는 항산화 활성에 중요한 역할을 하고 있음을 제시하였다 (Matsushita and Iwami, 1965). 또한, 선행연구에서 porphyrin계 화합물의 DPPH, ROS와 같은 free radicals을 소거하는 항산화 활성이 보고되었다 (Endo *et al.*, 1985; Hsu *et al.*, 2005). 따라서, 다시마로부터 분리된 porphyrin계 화합물은 지속적인 고혈당 상태에 의한 산화적 스트레스를 억제함으로써 강력한 최종당화산물형성 억제활성을 나타낸다고 사료될 수 있다. 또한, pheophorbide a가 pheophytin a보다 강력한 최종당화산물 형성 억제활성을 나타내는데, 이는 phytyl group의 부재와 함께 C-17²위치의 carboxyl group의 존재가 최종당화산물 형성의 억제활성에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

반면, lens aldose reductase 실험에서는 오직 pheophorbide a만이 억제활성을 나타내었다. 본 실험은 rat의 수정제를 균질화하여 효소로 사용하고 DL-glyceraldehyde를 기질로 하여 수행하였다. 양성 대조군인 quercetin ($1.17 \pm 0.17 \mu\text{M}$)과 비교하였을 때, pheophorbide a는 IC_{50} 값이 $12.31 \pm 1.19 \mu\text{M}$ 로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반면에 pheophytin a는 억제활성을 나타내지 않았다. 만성 고혈당 상태에서 증가된 oxidative stress는 ROS를 생성시킨다. ROS의 생성으로 인해 toxic aldehydes의 생성이 증가하고, 생성된 toxic aldehydes는

aldose reductase를 활성화시킨다. 이로 인해 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose로 전환된다 (Travis *et al.*, 1974; Malone *et al.*, 1980; Williamson *et al.*, 1993; Maccari *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). 선행연구에 따르면, flavonoid와 phlorotannin의 aldose reductase 활성의 억제제는 강력한 항산화력에 기인한 것이라고 알려져 왔다 (Costantino *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2001; Kawanishi *et al.*, 2003). 그러나, pheophorbide a는 강력한 lens aldose reductase 억제활성을 보이거나 pheophytin a는 그렇지 못한 것을 보아, porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성은 porphyrin ring에 포함된 이중결합에 의한 항산화 활성화에 기인한 것이 아니라 C-17²위치의 carboxyl group의 존재에 의한 것으로 생각된다.

이러한 결과들을 종합해보면, 다시마와 그로부터 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a는 당뇨병성 합병증을 예방하고 치료할 수 있는 기능성 식품으로서의 이용이 가능할 것으로 기대된다.

Table 5. *In vitro* activities of pheophorbide a and pheophytin a from *L. japonica* on RLAR and AGEs formation

Compounds	RLAR ^a	AGE ^b
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	Mean ± S.E.M.	Mean ± S.E.M.
Pheophorbide a	12.31 ± 1.19	49.43 ± 1.32
Pheophytin a	-	228.71 ± 0.07
Quercetin ^c	1.17 ± 0.17	
Aminoguanidin ^d		735.65 ± 6.71

RLAR: rat lens aldose reductase; AGE: advanced glycation end products.

^aThe concentration that caused 50% inhibition (IC₅₀) is given as the mean ± S.E.M. of duplicate experiments. ^bThe 50% inhibition concentration (μg/ml) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean ± S.E.M. of triplicate experiments. ^cQuercetin was used as a reference compound on lens aldose reductase inhibitory activity. ^dAminoguanidine was used as a reference compound on AGE formation inhibitory activity.

2-1-3. Phorphyrin계 화합물들의 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성

다시마 (*Laminaria japonica*)로부터 분리한 porphyrin계 화합물 (pheophorbide a, pheophytin a)이 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase에 대한 억제활성을 지님을 확인한 후, porphyrin계 화합물들의 활성과 구조간의 상관관계를 규명하기 위하여 Sigma에서 4종의 porphyrin계 화합물 (Fig 9)을 구매하여 실험을 수행하였다.

Sigma에서 구입한 porphyrin계 화합물의 최종당화산물 형성 억제활성 실험결과는 Table 6에 나타내었다. 구입한 porphyrin계 화합물들은 양성 대조군인 aminoguanidin보다 강력한 억제활성이 나타났다. 다시마로부터 분리한 pheophorbide a 와 pheophytin a의 억제활성과 비교해 보았을 때, 이들의 억제활성 정도는 protoporphyrin IX > pheophorbide a > chlorophyll a >> pheophytin a > hemin > hematin 순으로 측정되었다. Protoporphyrin IX의 IC₅₀ 값이 $49.43 \pm 1.32 \mu\text{M}$ 로 대조군인 aminoguanidin ($735.65 \pm 6.71 \mu\text{M}$)의 약 17배 정도로 가장 강력한 억제활성을 나타내었으며, 그 다음으로 chlorophyll a가 $69.45 \pm 1.94 \mu\text{M}$ 로 aminoguanidin보다 10배 정도 강한 활성을 보였다. 그리고 hemin과 hematin의 IC₅₀값이 각각 280.92 ± 1.83 , $299.14 \pm 2.04 \mu\text{M}$ 로 다소 낮은 활성을 보였으나, aminoguanidin에 비해 약 3배정도 활성이 강하게 나타났다.

이러한 결과로 비추어 볼 때, porphyrin계 화합물의 최종당화산물 형성억제 활성은 carboxyl group의 존재와 porphyrin ring내에 존재하는 금속이온에 의한 항산화력과 같은 복합적인 요인에 의해 나타나는 것임을 알 수 있다.

최종당화산물 형성억제 활성이 큰 화합물 pheophorbide a와 protoporphyrin IX는 모두 carboxyl group을 구조 내에 지니고 있는 반면, chlorophyll a와 pheophytin a는 C-17² 위치에 carboxyl group이 아닌 phytyl group를 가지면서 급격히 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있다. pheophytin a는 chlorophyll a의 porphyrin ring구조 내의 Mg²⁺이온이 탈락된 형태로 chlorophyll a보다 더욱 낮은 억제활성을 나타내었다. Endo 등 (Endo *et al.*, 1985)은 chlorophyll과 그 유도체들이 기본적으로 포함하는 porphyrin ring 구조 자체도 free radicals 생성 억제에 매우 중요한 역할을 하지만, chlorophyll의 porphyrin ring내의 마그네슘 이온의 존재로 인한 킬레이트 반응에 의해 더욱 강력한 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다. 따라서, porphyrin ring구조 내에 존재하는 금속이온의 킬레이트 반응에 의해 free radicals이 소거되면서 최종당화산물의 억제활성에 기여함을 알 수 있다.

Lens aldose reductase에 대한 억제활성 실험에서는 protoporphyrin IX와 hemin이 억제활성을 나타냈다. 이들의 IC₅₀ 값은 각각 55.45 ± 1.54 , 101.33 ± 2.61 μ M로, 양성 대조군인 quercetin (1.17 ± 0.17 μ M)과 다시마로부터 분리된 pheophorbide a (12.31 ± 1.19 μ M)와 비교하였을 때, protoporphyrin IX는 중간 정도의 활성을 보였고, hemin는 미미한 억제활성을 지니는 것으로 나타났다. 또한, chlorophyll a와 hematin은 lens aldose reductase에 대해 억제활성을 나타내지 않았고 앞서 pheophytin a도 억제 활성을 보이지 않았다. 종합해 보면, porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성은 이들 화합물이 기본적으로 포함하는 porphyrin ring 구조 내의 이중결합에 의한 항산화력 때문에 나타나는 것이 아니라, C-

17² 위치의 phytyl group의 부재와 동시에 carboxyl group의 존재가 lens aldose reductase 억제활성에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.



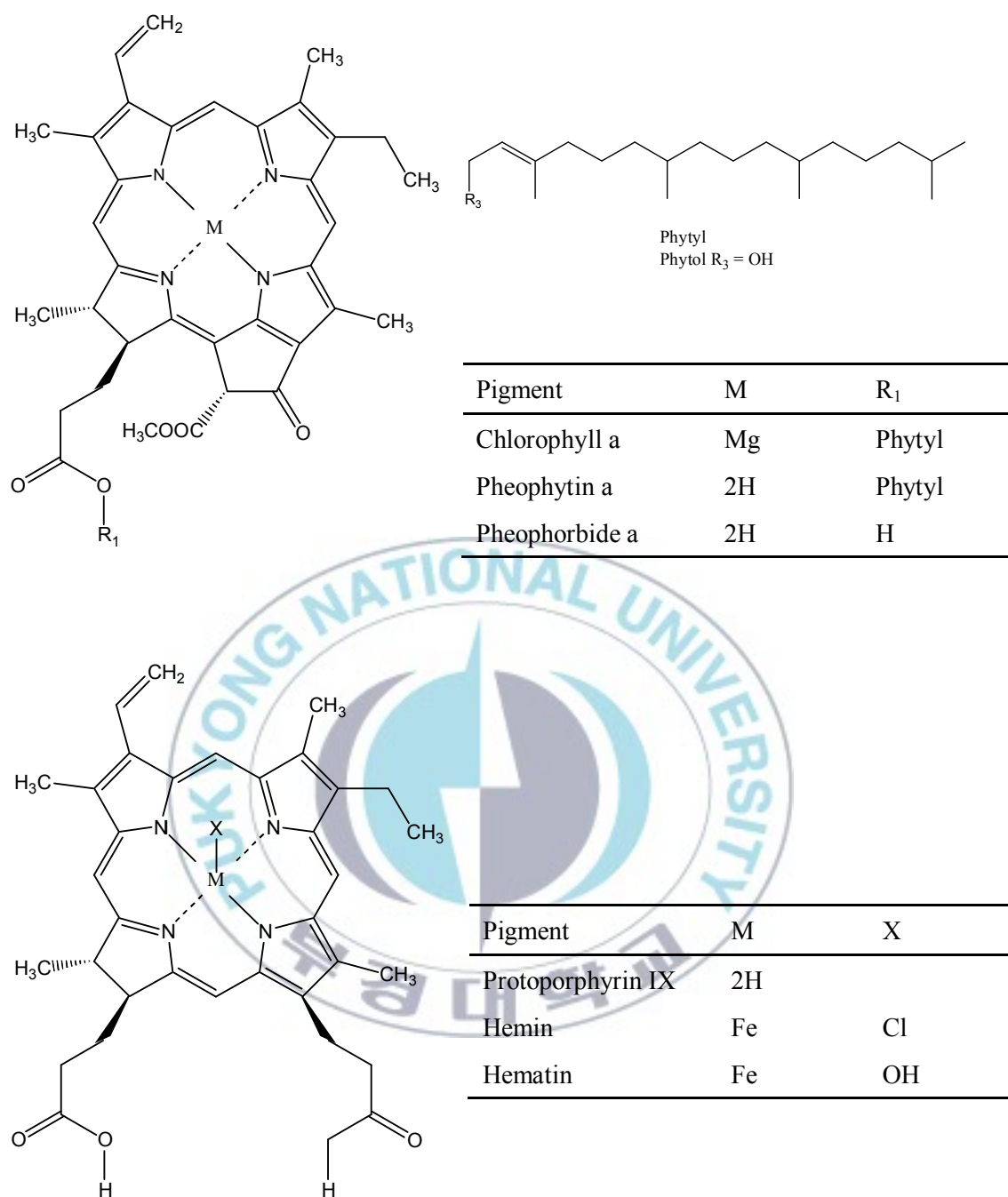


Fig. 9. Structures of isolated pheophorbide a and pheophytin a from *L. japonica* and porphyrin derivatives used in this study.

Table 6. *In vitro* inhibitory activities of commercially available porphyrin derivatives on RLAR and AGE formation

Compounds	RLAR ^a	AGE ^b
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	Mean ± S.E.M.	Mean ± S.E.M.
Chlorophyll a	-	69.45 ± 1.94
Protoporphyrin IX	55.45 ± 1.54	42.06 ± 1.03
Hemin	101.33 ± 2.61	280.92 ± 1.83
Hematin	-	299.14 ± 2.04
Quercetin ^c	1.17 ± 0.17	
Aminoguanidin ^d		735.65 ± 6.71

RLAR: rat lens aldose reductase; AGE: advanced glycation end products.

^aThe concentration that caused 50% inhibition (IC₅₀) is given as the mean ± S.E.M. of duplicate experiments. ^bThe 50% inhibition concentration (μg/ml) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean ± S.E.M. of triplicate experiments. ^cQuercetin was used as a reference compound on lens aldose reductase inhibitory activity. ^dAminoguanidine was used as a reference compound on AGE formation inhibitory activity.

3. 다시마 추출물로부터의 compound 1과 2의 정량분석

3-1. 다시마로부터 분리된 화합물의 검량곡선 검토

다시마로부터 분리된 compound 1 (pheophorbide a)와 2 (pheophytin a)를 HPLC 분석용 acetone에 녹여 Table 1에 나타난 조건에 따라 HPCL를 실시하였다. 각 농도와 그에 따른 peak의 넓이로부터 검량곡선을 작성하고 이를 validation 정량 분석에 사용하였다. HPLC 분석 결과, compound 1와 2는 각각 16.00 min과 45.85 min의 retention time을 나타내었다. compound 1은 31.25 µg/ml ~ 1.95 µg/ml의 농도범위에서 $R^2 = 0.9970$ 의 직선성을 나타내었으며, compound 2는 125.0 µg/ml ~ 7.8 µg/ml의 농도범위에서 $R^2 = 0.9999$ 의 직선성을 나타내어 분석에 적합함을 알 수 있었다 (Fig. 10).



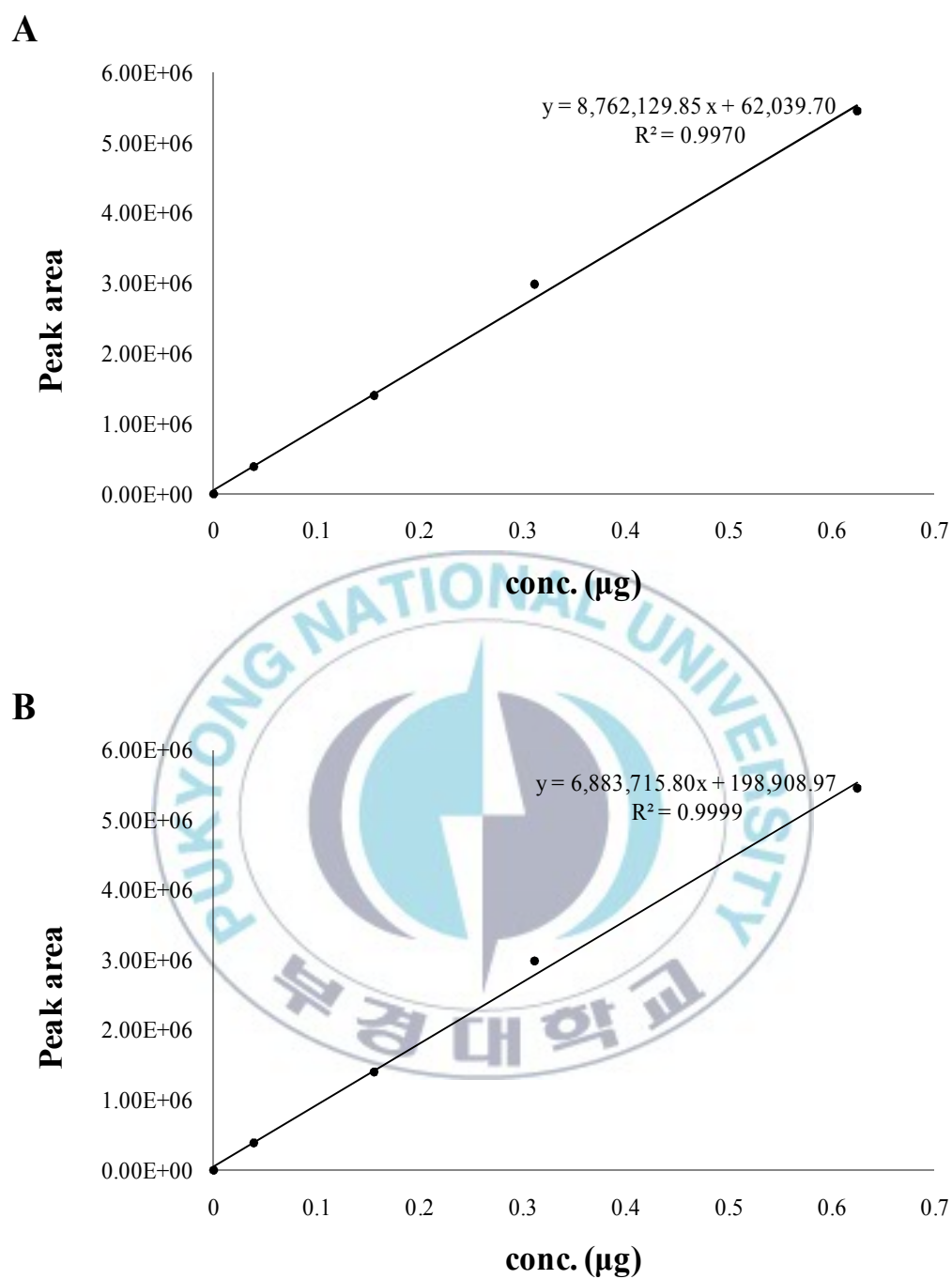


Fig. 10. Calibration curves of pheophorbide a (A) and pheophytin a (B) from *L. japonica*

3-2. 다시마 추출물의 pheophorbide a와 pheophytin a의 정량분석

다시마로부터 분리된 compound 1 (pheophorbide a)와 2 (pheophytin a)의 최적의 추출조건을 검토하기 위하여, MeOH와 CH₂Cl₂ 그리고 acetone으로 추출하여 얻은 각 추출물들의 compound 1과 2의 함유량을 측정하였다 (Fig. 11)

HPLC 동시분석 결과, 모든 추출물에서 16.00 min과 45.85 min에 compound 1과 2의 peak가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이들 화합물의 검량곡선을 이용하여 각 추출물 내의 함유량을 검토해 본 결과, MeOH 추출물에서 compound 1 함유량은 0.31 mg/g, compound 2의 함량은 2.24 mg/g으로 나타났다. 다음으로 CH₂Cl₂ 추출물에서는 compound 1과 2의 함유량이 각각 1.13, 13.74 mg/g로 나타났으며, acetone 추출물에서는 각각 3.15, 42.59 mg/g으로 나타났다. 종합해보면, 다시마를 acetone으로 추출하였을 때의 compound 1과 2의 함유량이 MeOH로 추출하였을 때의 함량보다 각각 10배와 20배씩 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Table 7 and Fig. 12). 따라서, compound 1과 2의 최적의 추출용매 조건은 acetone으로, 이를 이용한 추출법으로 생리활성물질의 함량이 높은 기능성식품의 생산을 기대할 수 있다.

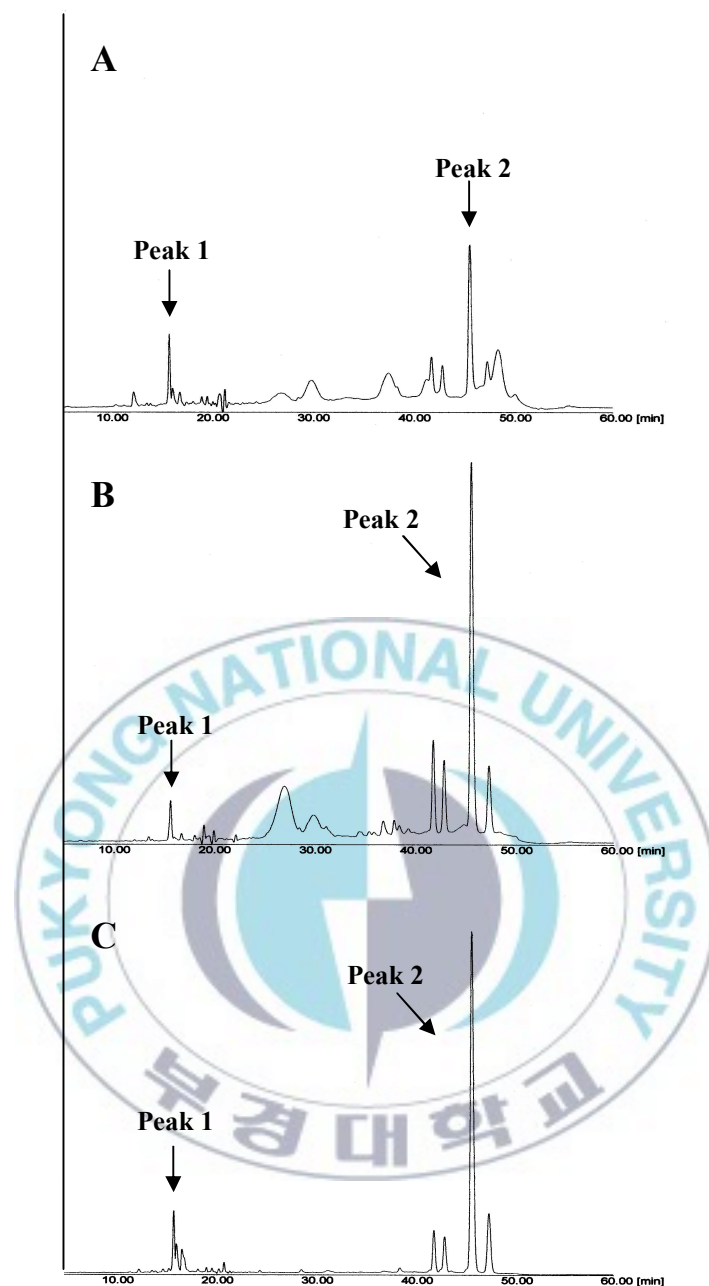


Fig. 11. HPLC chromatograms of MeOH (A), CH₂Cl₂ (B) and acetone (C) extract from *L. japonica*. A: MeOH extract; B: CH₂Cl₂ extract; C: Acetone extract. Peak 1 (Rt: 16.00 min, pheophorbide a); peak 2 (Rt: 45.85 min, pheophytin a).

Table 7. Contents of the pheophorbide a and pheophytin a in the MeOH, CH₂Cl₂ and acetone extract of *L. japonica*

Compounds	Retention time (min)	Contents (mg/g of extract)		
		MeOH	CH ₂ Cl ₂	Acetone
Pheophorbide a	16.00	0.31	1.13	3.15
Pheophytin a	45.85	2.24	14.3	42.93

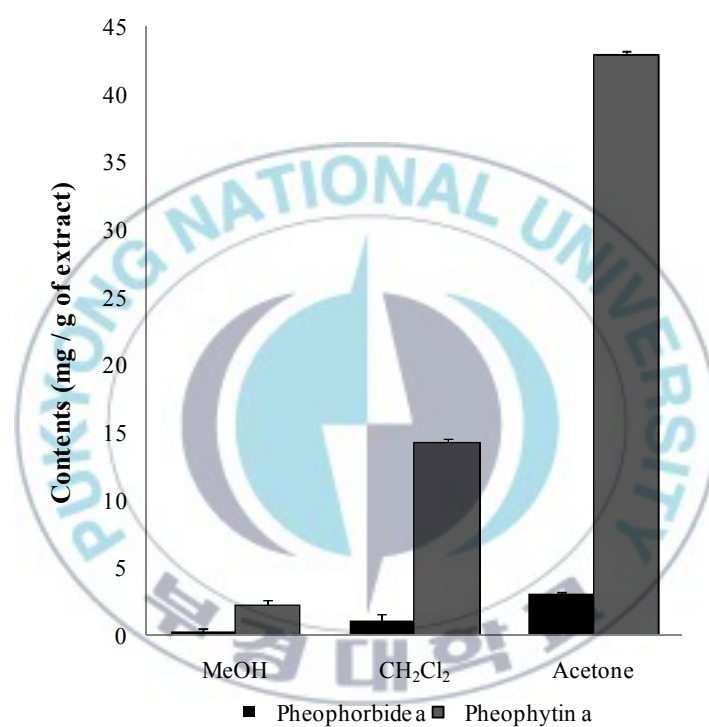


Fig. 12. Contents of the pheophorbide a and pheophytin a in the MeOH, CH₂Cl₂ and acetone extract of *L. japonica*.

IV. 요약 및 결론

당뇨성 합병증의 병태는 다양하며, 고혈당에 의한 것으로서 말초신경장애, 망막증, 신증, 백내장, 각막증 등이 있으며, 그 기전으로 polyol pathway 이상과 혈중의 과량의 당과 단백질의 반응에 의한 최종당화산물의 형성을 들 수 있다. Polyol pathway는 포도당 대사경로의 하나로 포도당은 aldose reductase에 의하여 sorbitol로 전환된다. 정상상태에서의 aldose reductase는 포도당에 대한 기질친화성은 매우 낮아 sorbitol을 거의 생성하지 않지만, 당뇨병 상태에서는 수정체, 말초신경, 망막과 같은 인슐린 비감수성의 조직에서의 포도당 농도가 상승하면 위의 경로에 의하여 과량의 sorbitol을 생성하게 되며, 이러한 각 조직에서의 sorbitol의 축적이 당뇨병 백내장, 말초신경장애, 당뇨병 망막증 등의 원인으로 알려져 있다.

또한 만성적 고혈당 상태에서 환원당의 carbonyl group이나 ketone group과 단백질의 amino group간의 반응에 의해 생성된 비가역적인 최종당화산물 (advanced glycation end products, AGEs)은 분해되지 않고 수명이 다 할 때 까지 혈청알부민 (serum albumin), 수정체 (lens crystalline), 세포 외 세포간질의 collagen과 같은 수명이 긴 단백질과 교차결합 (cross-link)하여 심각한 당뇨합병증과 알츠하이머 질환 그리고 염증반응을 유발한다 (Bucala *et al.*, 1995; Grillo and Colombatto, 2008). 그리하여 백내장 등의 당뇨병 합병증 예방 및 치료제로서 aldose reductase 및 최종당화산물 생성 억제제가 주목을 받고 있으며, 이들 몇몇 억제제가 동물실험 및 임상시험에서 당뇨병 합병증을

개선함이 보고되는 등 합성물질뿐만 아니라 천연물질로부터 aldose reductase 및 최종당화산물 생성 억제성분을 규명하려는 활발한 연구가 이루어지고 있다. Jang 등에 의해 *Erigeron annuus*로부터 분리된 phenolic compounds의 aldose reductase와 최종당화산물의 억제 활성이 밝혀졌으며 (Jang *et al.*, 2008), 많은 연구들을 통해 favonoids의 aldose reductase 억제 활성 (Varma *et al.*, 1977; Enomoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005)과 최종당화산물 억제 활성 (Wu and Yen, 2005; Urios *et al.* 2007)이 보고된 바 있다. 또한, 갈조류인 *Ecklonia stolonifera*로부터 분리된 phlorotannins (Jung *et al.*, 2008)이 aldose reductase와 최종당화산물에 대한 억제 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Jang *et al.*, 2008). 그러나 아직까지 식용 갈조류인 다시마와 그로부터 분리한 화합물의 aldose reductase와 최종당화산물 형성의 억제활성에 대한 연구는 이루어진 바 없다. 따라서, 본 연구에서 다시마의 MeOH 추출물과 각 분획물들의 aldose reductase 억제활성과 최종당화산물 형성의 억제활성을 검색하고, 활성을 지닌 분획물로부터 활성성분을 분리·동정하고, 이들 화합물의 구조와 활성간의 상관 관계를 규명하였다.

1. 다시마의 메탄올 추출물과 그로부터 얻어진 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H_2O 층에 대한 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 *in vitro* 실험을 통하여 검색하였다. 추출물과 분획물 중 EtOAc 분획물이 가장 강력한 최종당화산물 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 나타냈고, 그 다음으로 CH_2Cl_2 분획물이 높은 활성을 나타내었다.

그러나 CH_2Cl_2 분획물의 수율이 EtOAc 분획물의 수율보다 63배 가량 높으므로 활성을 나타내는 성분이 다량 함유되어 있을 것으로 예상하였다.

2. 최종당화산물 형성억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성이 높고 수율이 높은 CH_2Cl_2 분획물을 대상으로 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성 성분을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 1D NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)의 분광학적 방법을 이용하여 측정하였으며, 각각의 문헌치와 비교하여 pheophorbide a (1), pheophytin a (2)임을 확인하였다. 이들 화합물은 다시마에서는 처음으로 분리된 화합물이다. 이전의 연구들에서 pheophorbide a의 항산화 활성 (Hsu *et al.*, 2005), 간암세포에 대한 광역학적 치료효과 (Tang *et al.*, 2006), 피부암의 일종인 색소성 흑색종 (Lim *et al.*, 2004), 결장암 (Hajri *et al.*, 2002), 췌장암 세포 (Hajri *et al.*, 1999)등의 성장 억제 효과를 지니는 것으로 알려졌으며, ICR 마우스의 피부에서 항암효과와 항 염증효과를 지니는 것으로 밝혀졌다 (Nakamura *et al.*, 1996). Pheophytin a는 항 C형 간염효과 (Wanga *et al.*, 2009), 항산화 효과 (Higashi-Okai *et al.*, 2001)를 지니며, PC12 cells의 분화를 증폭시킴으로써 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환에 대한 치료효과를 나타내는 것으로 보고되었다 (Ina *et al.*, 2007). 또한, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도한 생쥐 포식세포에서 초과산화물 음이온 (O_2^-)의 생성을 억제하고, 생쥐 귀에서 부종과 같은 염증반응에 대해 강력한 억제효과를 가지는 것으로 밝혀졌다 (Okai and Higashi-Okai, 1997). 그러나, lens aldose reductase와 최종당화산물 형성에 대한

억제효과에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 pheophorbide a (1)와 pheophytin a (2)의 lens aldose reductase와 최종당화산물 형성에 대한 억제효과를 평가하였다.

3. 다시마로부터 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a의 최종당화산물 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 측정하였다. 최종당화산물형성 억제활성 실험에서, 다시마에서 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a는 대조군인 aminoguanidin보다 강력한 억제활성이 나타났으며, pheophorbide a의 IC_{50} 값은 $42.06 \pm 1.03 \mu M$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin ($735.65 \pm 6.71 \mu M$)보다 약 15배정도 높은 활성을 보였다. pheophytin a의 $228.71 \pm 0.07 \mu M$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin보다는 3배정도 강한 활성을 나타냈다. 이에 추가적으로 몇 가지의 porphyrin계 화합물의 최종당화산물 억제활성을 함께 검토하여 활성과 구조간의 상관관계를 규명하였다. 모든 화합물들이 대조군인 aminoguanidin보다 강력한 억제활성이 나타났으며, protoporphyrin IX > pheophorbide a > chlorophyll a >> pheophytin a > hemin > hematin 순으로 억제활성이 측정되었다. protoporphyrin IX, chlorophyll a, hemin과 hematin의 IC_{50} 값이 각각 49.43 ± 1.32 , 69.45 ± 1.94 , 280.92 ± 1.83 , $299.14 \pm 2.04 \mu M$ 로 대조군인 aminoguanidin ($735.65 \pm 6.71 \mu M$)의 약 17배와 10배 그리고 3배정도의 가장 강력한 억제활성을 나타내었다. Pheophorbide a와 pheophytin a는 chlorophyll a의 분해산물로, pheophorbide a는 Mg^{2+} 와 phytol이 제거된 형태이고 pheophytin a는 Mg^{2+} 만이 제거된 형태이다. 이는 phytol의 부재와 함께 C-17'위치의 carboxyl

group의 존재가 최종당화산물의 억제 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있으며, porphyrin ring구조 내에 금속이온의 존재가 최종당화산물의 억제활성에 기여하는 것으로 여겨진다.

4. Lens aldose reductase 실험에서는 오직 pheophorbide a만이 억제활성을 나타내었다. 양성 대조군인 quercetin ($1.17 \pm 0.17 \mu\text{M}$)과 비교하였을 때, pheophorbide a는 IC_{50} 값이 $12.31 \pm 1.19 \mu\text{M}$ 로 비교적 높은 활성을 나타낸 반면에 pheophytin a는 억제활성을 나타내지 않았다. 만성 고혈당 상태에서 증가된 ROS의 생성으로 인해 toxic aldehydes의 생성이 증가하고, 생성된 toxic aldehydes는 aldose reductase를 활성화시킨다. 선행연구에 따르면, flavonoid와 phlorotannin의 aldose reductase 활성의 억제는 강력한 항산화력에 기인한 것이라고 알려져 왔다 (Costantino *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2001; Kawanishi *et al.*, 2003). 추가적으로 몇 가지의 porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase을 함께 검토해 본 결과, protoporphyrin IX와 hemin의 IC_{50} 값은 각각 55.45 ± 1.54 , $101.33 \pm 2.61 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 또한, chlorophyll a 와 hematin은 lens aldose reductase에 대해 억제활성을 나타나지 않았다. 종합해 보면, porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성은 이들 화합물이 기본적으로 포함하는 porphyrin ring구조 내의 이중결합에 의한 항산화력 때문에 나타나는 것이 아니라, C-17² 위치의 phytyl group의 부재와 동시에 carboxyl group의 존재가 lens aldose reductase 억제활성에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

5. 다시마를 MeOH와 CH_2Cl_2 그리고 acetone으로 추출하여 얻은 각

추출물들의 pheophorbide a와 pheophytin a의 함유량을 측정하였다. HPLC 동시분석 결과, 모든 추출물에서 16.00 min과 45.85 min에 pheophorbide a와 pheophytin a의 peak가 나타났으며, MeOH 추출물의 pheophorbide a와 pheophytin a의 함유량은 각각 0.31, 2.24 mg/g이며, CH₂Cl₂ 추출물은 1.13, 13.74 mg/g으로 나타났다. 또한, acetone 추출물에서는 3.15, 42.59 mg/g의 함유량을 보여, 이들 추출물 중 acetone 추출물이 가장 높은 함유량을 지니는 것으로 나타나 최적의 추출용매임을 알 수 있다.

식용 갈조류인 다시마의 항산화 활성 (Han *et al.*, 2002), 항 돌연변이 활성 (Okai *et al.*, 1993), 혈당강화 효과 (Lee *et al.*, 1999)등이 이전의 연구들을 통해 밝혀졌으며, 다시마로부터 분리된 라미나린 (laminarine)의 혈압조절 효과 (Chiu and Fung, 1997), 알긴산 (alginic acid)의 장내 유해미생물의 증식억제 효과 (Hidaka *et al.*, 1986)와 혈중 콜레스테롤 저하 (Kim *et al.*, 2000), 혈당조절 작용 (Lee *et al.*, 1996)이 보고되었다. 또한, 다당류인 후코이단은 혈액응고 억제활성 (Collic *et al.*, 1991; Nishino *et al.*, 1989), 항 바이러스 효과 (Li *et al.*, 1995), 항암 효과 (Song *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000), 면역조절 활성 (Wang *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2004), 항산화 효과 (Li *et al.*, 2002), 혈중지질 강하작용 (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001), 항보체 활성 (Zvyagintseva *et al.*, 2002), 위 보호작용 (Shibata *et al.*, 2000), 신장질환과 요로질환 완화 효과 (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005)등의 생리활성이 나타났다. 이와 같이 다시마와 그로부터 분리해낸 성분의 다양한 생리활성에 대한 많은 연구들이 보고 되어 왔으나, 다시마와 다시마로부터 처

음으로 분리해낸 porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물형성의 억제활성에 대한 검증은 본 연구가 처음이며, 위와 같은 결과들을 미루어 보아 다시마와 porphyrin계 화합물의 당뇨병증의 예방과 치료에 효과적인 천연의약품으로서의 역할을 기대할 수 있다.



V. 참고문헌

김응진, 민헌기, 최길영, 당뇨병학, p 22-31, 고려의학, 1998.

보건복지가족부, 보건복지가족통계연보, p55, 2009.

Boldyrev, A. A., Retrospective and perspectives on the biological activity of histidine-containing dipeptides, *Int. J. Biochem.* 22, 129-132, 1990

Brett, J., Schmidt, A. M., Yan, S. D., Zou, Y. S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysiecki, C., Shaw, A., Migheli, A., and Stern D., Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues, *Am. J. Pathol.* 143, 1699-1712, 1993.

Bucala, R., Cerami, A., and Vlassara, H., Advanced glycosylation end products in diabetic complications, *Diabetes Rev.* 3, 258-268, 1995.

Ceriello, D., Giugliano, D., Quatraro, A., Dello russo, P., and Torella. R., A preliminary note on inhibiting effect of α -tocopherol on protein glycation, *Diabete Metab. (Paris)* 14, 40-42, 1998.

Chee, C. F., Lee, H. B., Ong H. C., and HO, A. S., Photocytotoxic pheophorbide-related compounds from *Aglaonema simplex*, *Chem. Biodivers.* 2, 1648-1655, 2005.

Cheng, H. H., Wang, H. K., Ito, J., Bastow, K. F., Tachibana, Y., Nakanishi, Y., Xu, Z., Luo, T. Y., and Lee, K. H., Cytotoxic pheophorbide-related compounds from *Clerodendrum calamitosum* and *C. cyrtophyllum*, *J. Nat. Prod.* 64, 915-919, 2001.

Chiu, K. W., Fung, A.Y., The cardiovascular effects of green beans (*Phaseous aureus*), common rue (*Ruta graveolens*), and kelp (*Laminaria japonica*) in rats, *Gen.Pharmacol.* 29, 859-862, 1997.

Collicie, S., Fischer, A. M., Tapon-Brethaudiere, H., Boisson, C., Durand, P., Jozefonvicz, J., Anticoagulant of a fucoidan fraction, *Thrombosis Res.*, 64, 143-147, 1991.

Collins, J. G. and Corder, C. N., Aldose reductase and sorbitol dehydrogenase distribution in substructures of normal and diabetic rat lens, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 16, 242-243, 1977.

Corns, C. M., Herbal remedies and clinical biochemistry, *Ann. Clin. Biochem.* 40, 489-507, 2003.

Costantino, L., Rastelli, G., Gamberini, M. C., Vinson, J. A., Bose, P., Iannone, A., Staffieri, M., Antolini, L., Del Corso, A., Mura, U. and Albasini, A., 1-Benzopyran-4-one antioxidants as aldose reductase inhibitors, *J. Med. Chem.* 42, 1881-1893, 1999.

Critchley, A. T., Introduction: seaweed resources. In: Seaweed cultivation and marine ranching, *Japan International Cooperation Agency (JICA)* 1, 6, 1993.

Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Nadezhda, E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology* 17, 541-552, 2007.

Dvornik, D., Simard-Duquesne, N., Krami, M., Sestanj, 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.

Edelstein, D., and Browmalee, M., Mechanistic studies of advanced glycosylation end products inhibition by aminoguanidine, *Diabetes* 41, 26-29, 1992.

Egorova-Zachernyuk, T. A., Rossum, B. V., Boender, G., Franken, E., Ashurst, J., Raap, J., Gast, P., Hoff, A. J., Oschkinat, H. and Groot H. J. M., Characterization of pheophytin ground states in *Rhodobacter sphaeroides* R26 photosynthetic reaction centers from multispin pheophytin enrichment and 2-D ¹³C MAS NMR dipolar correlation spectroscopy, *Biochemistry* 36, 7513-7519, 1997.

Endo, Y., Usuki, R., Kaneda, T., Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oil in the dark. II, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 1387-1390, 1985.

Enomoto, S., Okada, Y., Guvenc, A., Erdurak, C. S., Coskun, M. and Okuyama T., Inhibitory effect of traditional Turkish folk medicines on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O-methyl ether isolated from *Cistus laurifolius* L., *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1140-1143, 2004.

Gabbay, K. H., O'Sullivan, J. B., The sorbitol pathway: Enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord, *Diabetes* 17, 239-43, 1968.

González, C., Farías, G., Maccioni, R. B., Modification of tau to an Alzheimer's type protein interferes with its interaction with microtubules, *Cellular and molecular biology* 44, 1117-1127, 1998.

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.

Grillo, M. A., and Colombatto, S., Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases, *Amino Acids* 35, 29-36, 2008.

Hajri, A., Coffy, S., Vallat, F., Evrard S., Marescaux, J., Aprahamian, M., Human pancreatic carcinoma cells are sensitive to photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo*, *Br J Surg.* 86, 899-906, 1999.

Hajri, A., Wack, S., Meyer, C., Smith, M. K., Leberquier, C., Keding, M., Aprahamian, M., *In vitro* and *in vivo* efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells, *Photochem Photobiol.* 75, 140-8, 2002.

Han, J., Kang, S., Choue, R., Kim, H., Leem, K., Chung, S., Kim, C., Chung, J., Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*, *Fitoterapia* 73, 710-712, 2002.

Hargus, J. A., Fronczek, F. R., Vicente, M. G., and Smith, K. M., Mono-(L)-aspartylchlorin-e6, *Photochemistry and Photobiology* 83, 1006-1015, 2007.

Hayman, S., 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.

Heinrich, M., Bork, P. M., Schmitz, M. L., Rimpler, H., Frei, B., Sticher, O., Heinrich, M., Bork, P. M., Schmitz, M. L., Rimpler, H., Frei, B., Sticher, O., Pheophorbide A from *Solanum diflorum* interferes with NF-kappa B activation, *Planta Med.* 67, 156-7, 2001.

Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tashiro, Y., Effect of fructo oligosaccharide on intestinal flora and human health, *Bifidobacteria Microflora* 5, 37-50, 1986.

Higashi-Okai, K., Yamazaki, M., Nagamori, H., Okai, Y., Identification and antioxidant activity of several pigments from the residual green tea (*Camellia sinensis*) after hot water extraction, *J. OEH.* 23, 335-344, 2001.

Hsu, C. Y., Yang, C. M., Chen, C. M., Chao, P. Y., Hu, S. P., Effects of chlorophyll-related compounds on hydrogen peroxide induced DNA damage within human lymphocytes, *J. Agric. Food Chem.* 53, 2746-2750, 2005.

Hwang, J. A., Park, T. C., Jung, S. H., Kim, H. j., Kim, D. J., Kim, S. H., Nam, M. S., Kim, T. H., Lee, M. K., Lee, K. W., Direct medical costs of type 2 diabetic patients in the tertiary hospital, *Korean Diabetes* 32, 259-268, 2008.

Ina, A., Hayashi, K. I., Nozaki, H., Kamei, Y., Pheophytin a, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells, *Int. J. Devl Neuroscience* 25, 63–68, 2007.

Jang, D. S., Yoo, N. H., Lee, Y. M., Yoo, J. L., Kim, Y. S., Kim, J. S., Constituents of the fowers of erigeron annuus with inhibitory activity on the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase, *Archives of Pharmacal Research*, 31, 900-904, 2008.

Jin, D. Q., Li, G., Kim, J. S., Yong, C. S., Kim, J. A., and Huh, K., Preventive effects of *Laminaria japonica* aqueous extract on the oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1037-1040, 2004.

Jung, H. A., Yoon, N. Y., Woo, M. H., Choi, J. S., Inhibitory activities of extracts from several kinds of seaweeds and phlorotannins from the brown alga *Ecklonia stolonifera* on glucose-mediated protein damage and rat lens aldose reductase, *Fisheries Science* 74, 1363–1365, 2008.

Kaneko, M., Bucciarelli, M., Hwang, Y. C., Lee, L., Yan, S. F., Schmidt, A. M., Ramasamy, R., Aldose reductase and AGE-RAGE pathway: key players in myocardial ischemic injury, *Ann. NY Acad. Sci.* 1043, 702-709, 2005.

Kawanishi, K., Ueda, H. and Moriyasu, M., Aldose reductase inhibitor from the nature, *Current Medicinal Chemistry* 10, 1353-1374, 2003.

Kim, S. G., Choi, D. S., The present state of diabetes mellitus in Korea, *J Korean Med Assoc.* 51, 791-798, 2008.

Kim, Y. Y., Lee, K. W., Kim, G. B., Cho, Y. J., Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition, *J. Kor. Fish. Soc.* 33, 393-398, 2000.

Lander, H. M., Tauras, J.M., Ogiste, J. S., Hori, O., Moss, P. A., Schmidt, A. M., Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress, *J. Biol. Chem.* 272, 17810-17814, 1997.

Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Bresnick, E., Wheeler, D., and Wheeler, M., Isolation of compounds with antimutagenic activity from *Savoy Chieftain Cabbage*, *J.*

Agric. Food Chem. 37, 1363-1367, 1989.

Le Guen, C. A., Jones, A. F., Barnt, A. H., and Lunec, L., Role of reactive oxygen species on the generation of fluorescence by glycation, *Ann. Clin. Biochem.* 29, 184-189, 1992.

Ledesma, M. D., Pérez, M., Colaco, C., and Avila, J., Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments, *Cellular and molecular biology* 44, 1111-1116, 1998.

Lee, H. S., Choi, M. S., Park, S. H., Kim, Y. J., A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients (1)-Effect of seaweed supplementation on the gastrointestinal function and diabetic symptom control in streptozotocin-induced diabetic rats, *Korean J. Nutr.* 29, 286-295, 1996.

Lee, K. S., Bae, B. S., Bae, M. J., Jang, M. A., Seo, J. S., and Choi, Y. S., Effect of sea tangle and metformin on lipid peroxide and antioxidants levels in diabetic rats, *Korean J. Nutr.* 32, 230-238, 1999.

Lee, S. J., Bai, S. K., Lee, K. S., Namkoong, S., Na, H. J., Ha, K. S., Han, J. A., Yim, S. V., Chang, K., Kwon, Y. G., Lee, S. K., Kim, Y. M., Astaxanthin inhibits nitric oxide

production and inflammatory gene expression by suppressing I κ B kinase dependent NF- κ B activation, *Mol.cells.* 16, 97-105, 2003.

Lee, W. Y., Lim, D. S., Ko, S. H., Park, Y. J., Ryu, K. S., Ahn, M. Y., Kim, Y. R., Lee, D. W., Cho, C. W., Photoactivation of pheophorbide a induces a mitochondrial-mediated apoptosis in Jurkat leukaemia cells, *J Photochem Photobiol B.* 75, 119-26, 2004.

Lee, Y. S., Lee, S. H., Lee, H. S., Kim, B. K., Ohuchi, K. and Shin, K. H., Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues, *Biol. Pharm. Bull.* 28, 916-918, 2005.

Li, D. Y., Xu, R. Y., Zhou, W. Z., Sheng, X. B., Yang, A. Y., Cheng, J. L., Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice, *Acta Nutrim. Sin.* 24, 389-392, 2002.

Li, D. Y., Xu, Z., Huang, L. M., Wang, H. B., Zhang, S. H., Effect of fucoidan of *L. japonica* on rats with hyperlipidaemia, *Food Sci.* 22, 92-95, 2001.

Li, D. Y., Xu, Z., Zhang, S. H., Prevention and cure of fucoidan of *L. japonica* on mice with hypercholesterolemia, *Food Sci.* 20, 45-46, 1999.

Li, F., Tian, T. C., Shi, Y. C., Study on anti-virus effect of fucoidan *in vitro*, *J. N. Bethune Univ. Med. Sci.* 21, 255-257, 1995.

Lim, D. S., Ko, S. H., Lee, W. Y., Silkworm-pheophorbide α mediated photodynamic therapy against B16F10 pigmented melanoma, *J Photochem Photobiol B.* 74, 1-6, 2004.

Lim, S. S., Jung, S. H. and Ji, J., Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues, *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 653-668, 2001.

Liu, J. C., Zheng, F. L., Liu, Y. P., Effect of fucoidan on renal interstitial fibrosis in adenine-induced chronic renal failure in rats, *Nephrology* 13, 158, 2008.

Maccari, R., Ottaná, R., Curinga, C., Vigorita, M. G., Rakowitz, D., Steindl, T. and Langer, T., Structure-activity relationships and molecular modeling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 13, 2809-2823, 2005.

Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E. J., Yang, Z., Skolnik, E., Delaney, V., Friedman, E. A., Cerami, A., and Vlassara, H., Advanced glycosylation end products in patients with

diabetic nephropathy, *N. Engl. J. Med.* 325, 836-842, 1991.

Malone, J. I., Knox, G., Benford, S. and Tedesco, T. A., Red cell sorbitol: An indicator of diabetic control, *Diabetes* 29, 861-864, 1980.

Matsushita, S., Iwami, N., Antioxidative abilities of some porphyrins on the oxidation of sodium linoleate, *Arch. Biochem. Biophys.* 112, 476-477, 1965.

Mattson, M. P., Carney, J. W., Butterfield, D. A., A tombstone in Alzheimer's?, *Nature* 373, 481, 1995.

Nakamura, Y., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Inhibitory effect of pheophorbide a, a chlorophyll-related compound on skin tumor promotion in ICR mouse, *Cancer Lett.* 108, 247-255, 1996.

Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A., Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins, *J. Biol. Chem.* 267, 14998-15004, 1992.

Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., Nagumo, T., Isolation, purification and characterization of fructose-containing sulfated polysaccharides from the brown

seaweed *Ecklonia jurome* and their blood-anticoagulant activities, *Carbohydrate Res.* 186, 119-129, 1989.

Okai, Y. and Higashi-Okai, K., Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-Nori), *Int. J. Immunopharma.* 6, 355-358, 1997.

Okai, Y., Higashi-Okai, K., and Nakamura, S., Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica* (Makonbu) and *Undaria pinnatifida* (Wakame) by the umu gene expression system in *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002), *Mutat. Res.* 303, 63-70, 1993.

Park, M. J., Song, Y. S., Han, J. S., Protective effects of the BuOH fraction from *Laminaria japonica* extract on high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells, *J. Food. Sci. Nutr.* 11, 94-99, 2006.

Parmer, N. S. and Ghosh, M. N., Effect of gossypin, a flavonoid, on the formation of galactose-induced cataracts in rats, *Exp. Eyeh Res.* 29, 229-232, 1979.

Peyrou, J. and Sternberg, M., Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes, *Pathol. Biol.* 54, 405-419, 2006.

Rahbar, S., and Figarola, J. L., Novel inhibitors of advanced glycation endproducts, *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 63-79, 2003.

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.

Shi, Z. Y., Guo, Y. Z., Wang, Z., Pharmacological activity of fucoidan from *Laminaria japonica*, *J. Shanghai Fish. Univ.* 9, 268-271, 2000.

Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Aiyama, R., Iha, M., Ueyama, S., Yokokura, T., Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* tokida in gastric mucosal protection, *BioFactors*. 11, 235-245, 2000.

Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., and Kowall, N., Oxidative damage in Alzheimer's, *Nature* 382, 120-121, 1996.

Sobolev, A. P., Brosio, E., Gianferri, R. and Segre, A. L., Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR Spectra, *Magn. Reson. Chem.* 43, 625-638, 2005.

Song, J. Q., Xu, Y. T., Zhang, H. K., Immunomodulation action of sulfate polysaccharide

of *Laminaria japonica* on peritoneal macrophages of mice, *Chin. J. Immunol.* 16, 70-70, 2000.

Tang, P. M., Chan, J. Y., Au, S. W., Kong, S. K., Tsui, S. K., Waye, M. M., Mak, T. C., Fong, W. P., Fung, K. P., Pheophorbide a, an active compound isolated from *Scutellaria barbata*, possesses photodynamic activities by inducing apoptosis in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Biol Ther.* 5, 1111-6, 2006.

Tapsell, L. C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C. S., Sullivan, D. R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J. B., Clifton, P. M., Williams, P. G., Fazio, V. A., Inge, K. E., Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future, *Med. J. Aust.* 185, 4-24, 2006.

Task Force Team: Korean Diabetes Association/Health Insurance Review & Assistant, Diabetes in Korea 2007, *Seoul, Goldfishery* 57, 2007.

Travis, S. F., Morrison, A. D., Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I. and Oski, F. A., The role of the polyol pathway in metahemoglobin reduction in human red cells, *Br. J. Haematol.* 27, 597-605, 1974.

Urios, P., Grigorova-Borsos, A. M., Sternberg, M., Flavonoids inhibit the formation of

the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure, *Eur. J. Nutr.* 46, 139-146, 2007.

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.

Varma, S. D., Mizuno, A. and Kinoshita, J. H., Diabetic cataracts and flavonoids, *Science* 195, 205-206, 1977.

Vinson, J. A., and Howard III, T. B., Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients, *J. Nutr. Biochem.* 7, 659-663, 1996.

Vlassara, H., Recent progress in advanced glycation endproducts and diabetic complications, *Diabetes* 46, 19-25, 1997.

Wang, W. T., Zhou, J. H., Xing, S. T., Guan, H. S., Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice, *Chin. J. Pharm Toxicol.* 8, 199-202, 1994.

Wanga, S. Y., Tseng, C. P., Tsai, K. C., Lin, C. F., Wen, C. Y., Tsay, H. S., Sakamoto, N., Tseng, C. H., and Cheng, J. C., Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385, 230-235, 2009.

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 complication, *Diabetes* 42, 801-813, 1993.

Wolff, S. P., Jiang, X. Y., and Hunt, J.V., Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing, *Free Rad. Biol.Med.* 10, 339-352, 1999.

Wu, C. H. and Yen, G. C., Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts, *J. Agric. Food Chem*, 53, 3167-3173, 2005.

Wu, X. W., Yang, M. L., Huang, X. L., Yan, J., Luo, Q., Effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on radioprotection and splenic lymphocyte apoptosis, *Med. J. Wuhan Univ.* 25, 239-241, 2004.

Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., Pinsky, D., and Stern, D., Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of AGE's with their

receptors/binding proteins, *J. Biol. Chem.* 269, 9889-9897, 1994.

Zhang, Q. B., Li, N., Zhao, T. T., Qi, H. M., Xu, Z. H., Li, Z. E., Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active Heymann nephritis, *Phytother. Res.* 19, 50-53, 2005.

Zvyagintseva, T., Shevshenko, N., Nazarova, I., Scobun, A., Luk'yanov, P., Elyakova, L., Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds, *Comp. Biochem. Phys. C.* 126, 209-215, 2002.



감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없이 격려해주시고 도와주신 많은 분들께 이 자리를 빌어 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

먼저, 변함없는 관심과 가르침으로 이끌어 주신 최재수 교수님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 늘 새로운 연구에 도전하시며 365일 한결 같은 열정을 몸소 보여주신 교수님을 잊지 못할 것 같습니다.

또한 바쁘신 와중에 귀중한 시간을 내주셔서 논문을 심사해주시고 아낌없는 조언을 해주신 김형락 교수님, 남택정 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 학부과정에서부터 좋은 강의와 말씀으로 큰 가르침을 주신 변대석 교수님, 류은순 교수님, 류홍수 교수님, 김재일 교수님께도 깊이 감사 드립니다. 실험실에서 함께 생활하며 많은 도움 주시고 지금은 교수님이 되신 정현아 교수님께도 감사 드립니다.

지난 2년 동안 실험실에서 함께 동고동락하며 그 누구보다 큰 힘이 되어준 소중한 친구 성은이와 진주에게도 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 부족한 언니지만 믿고 잘 따라와준 보라와 혜은이, 먼 타국에서 와 열심히 연구하는 Nurul, Dafang, Sabiha, 짧은 시간이었지만 늘 밝은 얼굴로 힘이 되어준 학부생 정민이, 주미, 안나에게도 고마움을 전합니다. 그리고 여러 가지로 신경 써주시고 도와주신 식품생명과학과 조교선생님들과 그 외 대학원 선·후배님들께도 감사 드립니다.

힘들고 지칠 때마다 큰 격려와 힘이 되어주고 부족한 친구를 늘 토닥여준

내 소중한 친구들에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 제가 세상에서 가장 존경하고 사랑하는 아버지, 어머니께 진심으로 감사 드립니다. 아버지께서 저 때문에 하고 계신 고생과 희생에 비하면 아무 것도 아니라는 생각에 힘들 때마다 마음을 다잡을 수 있었습니다. 늘 못난 딸의 짜증과 투정을 다 받아주시고 제 편이 되어 울고 웃어주신 어머니의 사랑으로 힘을 낼 수 있었습니다. 그리고 항상 의젓한 모습으로 누나를 응원해주는 남동생 원일에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 가족의 소중한 감사한 마음 잊지 않고 부끄럽지 않은 큰딸, 누나가 될 수 있도록 항상 노력하며 살아가겠습니다.



2010년 12월

손유경 올림