

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0113951 (43) 공개일자 2011년10월19일
(51) Int. Cl. <i>C09K 15/08</i> (2006.01)	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내	
(21) 출원번호 10-2010-0033314	(72) 발명자 손병화 부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 화학과	
(22) 출원일자 2010년04월12일 심사청구일자 2010년04월12일	(74) 대리인 이덕록	

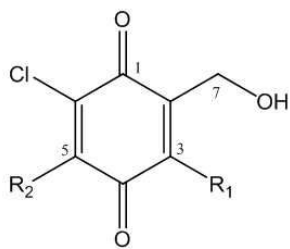
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 해양균류 포마 헤르바룸으로부터 분리한 항산화 활성을 갖는 신규 화합물

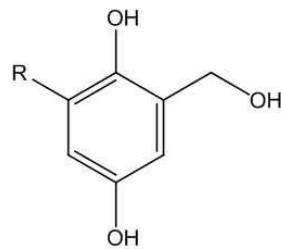
(57) 요약

본 발명은 해양균류 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)으로부터 분리한 항산화 작용이 있는 신규 화합물에 관한 것으로, 해양 홍조 참가사리(*Gloiopeltis tenax*)에서 분리한 포마 헤르바룸 균류 배양액에서 항산화 활성을 갖는 신규한 화합물인 브로모클로로젠티실퀴논 A 및 B를 제공한다.

대표도 - 도1



브로모클로로젠티실퀴논 A (1): R₁=Br, R₂= H
브로모클로로젠티실퀴논 B (2): R₁=H, R₂= Br
클로로젠티실퀴논 (5): R₁, R₂= H



클로로젠티실 알코올 (3): R = Cl
젠티실 알코올 (4): R = H

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2008-314-F00048/없음

부처명 학술진흥재단/국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구과제지원(공동연구)/해양생명공학사업-해양천연물신약연구개발

연구과제명 식용 해조류-공생미생물의 Partnership 유래 Receptor Tyrosine Kinase(RTK) 억제 약물
연구/해양미생물자원의 다양성 확보와 해양천연물 Library 구축

기여율

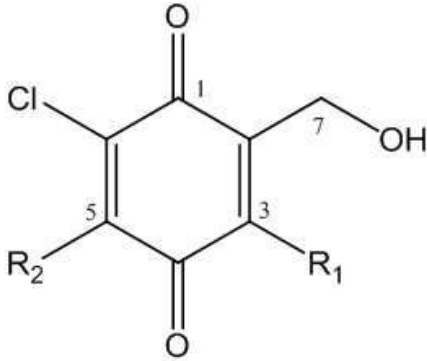
주관기관 부경대학교/서울대학교

연구기간 2008년 7월 1일~2011년 6월 30일/2010년 1월 1일~2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

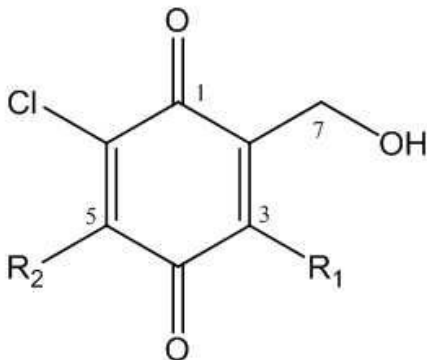
다음 화학식으로 표시되는 것임을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 브로모클로로젠티실퀴논 A :



상기 화학식에서, R₁은 Br을 나타내며 R₂는 H를 나타낸다.

청구항 2

다음 화학식으로 표시되는 것임을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 브로모클로로젠티실퀴논 B :



상기 화학식에서, R₁은 H를 나타내며 R₂는 Br을 나타낸다.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 하는, 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 해양 홍조류 참가사리(*Gloiopeltis tenax*)에서 분리한 해양균류인 포마 헤르바륨(*Phoma herbarum*)으로부터 유도된 신규 화합물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 해양균류인 포마 헤르바륨으로부터 분리한 뛰어난 항산화 활성을 갖는 신규 화합물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자유 라디칼은 쌍을 이루지 않은 전자를 갖는 원자, 이온, 또는 분자로서, 자유 라디칼, 특히 산소 분자로부터 유도된 자유 라디칼은 여러 가지 생물학적 현상에 있어서 기본적인 기능을 한다. 다양한 형태의 산소와 자유 라디칼의 농도가 과다할 경우, 생체내에 막 지질의 과산화, 핵산 염기의 히드록실화 및 설포히드릴기와 기타 단백질 내의 라디칼 활성 부분의 산화와 같은 심각한 역효과를 미칠 수 있으며, 이들이 억제되지 않을 경우, 변이와

세포 사멸을 초래할 수 있다.

[0003] 많은 자유 라디칼 반응은 생체분자에 산화 손상을 일으키며, 단백질을 가교시키고, DNA를 변이시키며, 지질을 과산화시킨다. 자유 라디칼이 일단 형성되면, 이들은 상호작용에 의해 다른 자유 라디칼 및 비 라디칼 산화제 등을 생성한다. 또한, 자유 라디칼 반응의 생성물 중 일부가 손상되면 잠재적으로 손상을 일으키는 화학종을 생성할 수 있다. 산소 자유 라디칼은 또한 단백질의 산화 변성을 일으킨다. 또한, 자유 라디칼의 산화 손상은 알츠하이머병, 류마티스 관절염, 암 및 죽상동맥경화증과 같은 노화 및 퇴행성 질환에서 주원인으로 작용한다고 보고되고 있다.

[0004] 이에, 항산화 작용을 하는 여러 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 신규한 항산화 물질을 발견하기 위한 노력이 계속되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 예의 연구를 진행한 결과 도출된 것으로, 특히 해양 홍조류 참가사리(*Gloiopeitis tenax*)로부터 분리한 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)으로부터 분리된 뛰어난 항산화 활성을 갖는 신규한 화합물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 해양 홍조류 참가사리(*Gloiopeitis tenax*)로부터 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)을 분리하고 배양한 후 상기 균주 배양액으로부터 신규한 화합물을 추출, 분리하여 이의 구조를 분광학적 데이터 분석을 통해 밝혀내고 라디칼 소거 검정을 통해 항산화 활성을 평가함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0007] 본 발명의 신규 화합물은 우수한 항산화 활성을 가지며, 또한, 기존에 항산화 물질로 사용되는 아스코르브산에 비해 뛰어난 항산화 활성을 가지는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 본 발명의 포마 헤르바룸으로부터 분리한 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2), 클로로젠티실 알코올 (3), 젠티실 알코올 (4)의 화학구조를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 해양 홍조 참가사리(*Gloiopeitis tenax*)로부터 분리된 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)의 배양액에 할로젠화염을 첨가하여 할로젠화 벤조퀴논 유도체의 생성을 유도한다. 포마 헤르바룸으로부터 신규한 두 개의 1,1-디페닐-2-피크릴히드라질(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH) 자유-라디칼-소거 활성을 발현하는 신규한 두 개의 할로젠화 벤조퀴논인, 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2) 외에, 이미 보고된 바 있는 두 개의 벤질알코올인 클로로젠티실 알코올 (3) 및 젠티실 알코올 (4)이 분리되었다.

[0010] 실시예 1. 해양 균류 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)의 분리 및 배양

[0011] 해양 균류인 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)을 통영 척포에서 채집한 식용의 해양 홍조 참가사리(*Gloiopeitis tenax*)로부터 분리하여 99%의 동일성으로 18S rRNA 분석(SolGent Co., Ltd., 대전, 한국)으로 기초로 동정하였다. 이 진균 균류를 포마 헤르바룸 MFA301(*Phoma herbarum* MFA301)로 명명하고 국립농업과학원 농업유전자원센터 (미생물 수탁번호: KACC93091P)에 기탁하였다. 증거표본은 코드 MFA301로 부경대학교에 기탁되었다.

[0012] 해양 균류인 포마 헤르바룸을 소이톤(soytone) 0.1%, 가용성 전분 1.0% 및 해수 100%로 구성된 SWS 배지에 배양(1L x 10)하였다. 배양물을 회전식 진탕기에서 120 rpm으로 10일간 29℃에서 배양하였으며 그 후 CaBr₂ 50 mM을 첨가하였다. 동일한 조건 하에서 10일간 추가 배양하였다. 대조균을 상기와 같은 조건 하에서 CaBr₂를 첨가하지 않고 배양하였다.

- [0013] 실시예 2. 해양 균류 포마 헤르바룸(*Phoma herbarum*)으로부터의 신규 화합물의 추출, 분리 및 분광학적 분석
- [0014] 균사체 및 배양액을 가-제로 여과하여 분리하였다. 배양액을 EtOAc로 추출하여 조추출물 0.8 g을 수득하였다. 추출물을 실리카겔 플래시 크로마토그래피(silica gel flash chromatography)에 주입한 후 단계적으로 0-100%로 n-헥산-EtOAc로 용출시켜 5개 분획을 수득하였다. DPPH 소거[1,1-디페닐-2-피크릴하이드라질(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH)] 활성인 분획 2를 H₂O-MeOH 구배 용출법을 사용하여 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography; MPLC)(ODS-A)로 분리하여 조화합물 1 및 2를 수득하였다. 이들 각각의 조화합물을 50% MeOH에서 100% MeOH의 30분 구배 프로그램을 사용한 HPLC(YMC, ODS-A, 10 x 250 mm, 1 ml/분)로 추가로 정제하여 6.5 mg의 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 6.0 mg의 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)를 수득하였다. 분획 3으로부터 상기와 같은 크로마토그래피 방법으로 15 mg의 클로로젠티실 알코올 (3) 및 5.0 mg의 젠티실 알코올 (4)을 분리하였다.
- [0015] 브로모클로로젠티실퀴논 A (1): 황색 고형; IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3399, 3064, 2927, 2853, 1670, 1588, 1428, 1316, 1269, 1232, 1204, 1103, 1025, 941, 876, 803 cm^{-1} ; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) (log ϵ) 204 (4.8), 276 (4.4) nm; MS (EI) m/z 250 [M]⁺(48), 252 [$M+2$]⁺(65), 254 [$M+4$]⁺(16), 234 (11), 224 (6), 206 (11), 167 (2), 153 (7), 142 (20), 115 (13), 97 (6), 79 (40), 61 (25), 53 (100); HRMS (EI) m/z 249.9032 [M]⁺ (calcd for C₇H₄O₃⁷⁹Br³⁵Cl, 249.9032)(+0.0 ppm/+0.0 mmu); NMR 스펙트럼 데이터는 표 1을 참조.
- [0016] 브로모클로로젠티실퀴논 B (2): 황색 고형, IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3401, 3058, 2921, 1673, 1587, 1316, 1232, 1103, 1025, 941, 875 cm^{-1} ; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) (log ϵ) 204 (4.9), 276 (4.9) nm; MS (EI) m/z 250 [M]⁺(82), 252 [$M+2$]⁺(100), 254 [$M+4$]⁺(27), 234 (12), 224 (5), 206 (16), 195 (5), 167 (9), 159 (2), 131 (7), 113 (9), 97 (4), 87 (31), 79 (23), 53 (50); HRMS (EI) m/z 249.9034 [M]⁺ (calcd for C₇H₄O₃⁷⁹Br³⁵Cl, 249.9032)(+0.7 ppm/+0.2 mmu); NMR 스펙트럼 데이터는 표 1을 참조.

표 1

브로모클로로젠티실퀴논 A(1) 및 B(2)^a에 대한 NMR 스펙트럼 데이터

탄소 위치	브로모클로로젠티실퀴논 A(1)			브로모클로로젠티실퀴논 B(2)		
	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C} (mult.)	HMBC (H → C)	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C} (mult.)	HMBC (H → C)
1		177.9 (s)			176.5 (s) ^b	
2		145.5 (s)			149.8 (s)	
3		136.8 (s)		6.84 (t, 2.0)	129.0 (d)	1, 5, 7
4		176.1 (s)			177.8 (s) ^b	
5	7.55 (s)	133.0 (d)	1, 3, 6		134.9 (s)	
6		142.5 (s)			143.5 (s)	
7	4.45 (s)	58.1 (t)	1, 2, 3, 4 ^c	4.36 (d, 2.0)	57.4 (t)	1, 2, 3, 4
7-OH	5.32 (br s)			5.54 (br s)		

^a400 MHz (¹H) 및 100 MHz (¹³C)에서의 DMSO-d₆에서 기록됨.

^b교환가능함.

^c약한 상관관계.

- [0017]
- [0018] 클로로젠티실 알코올 (3) 및 젠티실 알코올 (4)은 무색의 고체로서 분리되었으며 문헌의 데이터와 비교하여 동

정하였다.

[0019] 실시예 3. 화합물의 구조 결정

[0020] 염화칼슘(CaCl_2) 염을 첨가한 배양액 추출물의 TLC 양상은 염화칼슘(CaCl_2) 염을 첨가하지 않은 대조군의 추출물과는 상이함을 나타낸다. 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2)에 상응하는 두 개의 신규한 물질이 TLC 분석에 의해 검출되었으며 반복된 실리카겔 플래시 크로마토그래피(비율을 달리하는 n-헥산 및 에틸 아세테이트 혼합용액) 및 HPLC(ODS-A)로 정제하여 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2)를 분리하였다.

[0021] 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)는 HR-EI-MS 및 ^{13}C NMR 데이터로부터 $\text{C}_7\text{H}_4\text{BrClO}_3$ 의 분자식이 확인되었으며, EI-MS에서 100:135:33의 비율로 m/z 250 [$\text{M} (^{35}\text{Cl}, ^{79}\text{Br})^+$] (48), 252 [$\text{M} (^{37}\text{Cl} ^{79}\text{Br})^+$] (65) 및 254 [$\text{M} (^{37}\text{Cl} ^{79}\text{Br})^+$] (16)의 동위원소 클러스터가 관찰되어 하나의 브롬 및 하나의 염소 원자의 존재가 확인되었다. 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 IR 스펙트럼은 히드록실(3399 cm^{-1}) 및 퀴논(1670 cm^{-1}) 작용기 유래의 흡수 피크가 관찰되었다. DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), TOCSY(Toolboxes for Complex Systems), HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) 및 HMBC(Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) 실험을 포함하는, 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼의 상세한 분석 결과 히드록시메틸 및 2,2',3-삼중치환 벤조퀴논기에 의한 시그널이 관찰되었다(표 1 및 도 1 참조). 후자의 부분구조는 UV 스펙트럼 데이터[204 nm (log ϵ 4.8), 276 (4.4)]에 의해 추가로 확인되었다. 그리고, 5-H 내지 C-1, C-3 및 C-6과 7- H_2 와 C-1, C-2 및 C-3 간의 중요한 HMBC 상관관계로부터 C7-C2 결합뿐만 아니라 2-히드록시메틸, 3-브로모 및 6-클로로기 [δ_{C} 142.5 (s, C-6)]의 위치도 확인되었다. 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 클로로젠티실 알코올 (3)의 탄소골격은 동일한 생합성 경로를 통해 형성된 것으로 추정되므로, 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 6-클로로기의 위치는 클로로젠티실 알코올 (3)에서와 동일할 것으로 생각된다. 이는 또한 화합물 1의 탄소-6의 화학적 이동값 [δ_{C} 142.5 (s, C-6)]이 클로로젠티실퀴논 (5)의 탄소-6의 화학적 이동값 [145.0 (s, C-6)] 과 유사한 값이 관찰되어 6-클로로기의 위치가 다시 한번 확인되었다. 클로로젠티실퀴논 (5)에서의 sp^2 -메틴 [δ_{H} 6.78 (1H, dd, $J=2.3, 2.5\text{ Hz}$, 3-H) 및 δ_{C} 131.5 (d, C-3)]이 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)에서의 sp^2 -4차 탄소 [δ_{C} 136.8 (s, C-3)]으로 변화된 C-3에서의 NMR 시그널을 제외하고는, 화합물 1의 NMR 스펙트럼의 일반적 특징은 클로로젠티실퀴논 (5)의 NMR 스펙트럼 시그널과 상당히 유사하다. 그러므로, 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 구조는 3-브로모-6-클로로-2-히드록시메틸-1,4-벤조퀴논으로서 특성화된다.

[0022] 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)는 또한 황색의 고형상으로 수득된다. 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 5-위치의 sp^2 -메틴 그룹 [δ_{H} 7.55(1H, s, 5-H) 및 δ_{C} 133.0 (d, C-5)]이 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)에서 sp^2 -4차 탄소 [δ_{C} 134.9 (s, C-5)]로 변화되고, 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 3-위치의 sp^2 -4차 탄소 [δ_{C} 136.8 (s, C-3)]가 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)에서 sp^2 -메틴 그룹 [δ_{H} 6.84 (1H, t, $J=2.0\text{ Hz}$, 3-H) 및 δ_{C} 129.0 (d, C-3)]으로 변화되는 드의 NMR 시그널을 제외하고는, 화합물 2의 MS, UV, IR 및 NMR 스펙트럼의 일반적 특징은 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)와 상당히 유사하다(표 1 참조). 하나의 sp^2 메틴의 위치는 3-H와 7- H_2 사이의 아릴 결합($J_{3\text{H}-7\text{H}_2}=2.0\text{ Hz}$)뿐만 아니라 H-3과 C-7, 및 7- H_2 와 C-3간의 HMBC 교차피크로부터 4- sp^2 -메틴 그룹이 추정된다. DEPT, TOCSY, HMQC 및 HMBC 실험으로부터의 결과를 포함한 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼의 자세한 분석으로 화합물 2는 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 레지오아이소머(regioisomer)인, 5-브로모-6-클로로-2-히드록시메틸-1,4-벤조퀴논임을 제시하였다. 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)의 이상의 데이터를 브로모클로로젠티실퀴논 A (1)의 데이터와 비교하여 브로모클로로젠티실퀴논 B (2)의 구조를 결정하였다.

[0023] 클로로젠티실 알코올 (3) 및 젠티실 알코올 (4)는 알려진 화합물로서 보고된 데이터와 비교하여 확인하였다.

[0024] 본 발명의 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2), 클로로젠티실 알코올 (3) 및 젠티실 알코올 (4)의 구조식은 도 1에 상세히 도시하였다.

[0025] 실시예 4. 라디칼 소거 검정 및 항산화 활성 측정

[0026] 본 발명의 브로모클로로젠티실퀴논 A (1) 및 B (2), 클로로젠티실 알코올 (3) 및 젠티실 알코올 (4)의 시료를 MeOH에 용해시키고 이 용액 160 μ L를 96-웰 미세액가 트레이의 웰에 분주한 후, DPPH를 MeOH에 용해시킨 용액 (1.5×10^{-4} M) 40 μ L를 각 웰에 첨가하였다. 혼합물을 진탕하고 30분간 정치 후 결과적으로 생성된 용액의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Packard Co., Spectra Count™)로 520 nm에서 측정하였다. DPPH 라디칼에서의 소거능을 대조군인 공시험 용액(MeOH 160 μ L 및 DPPH 용액 40 μ L로 구성됨)의 흡광도를 50% 감소시키는 화합물의 농도(IC₅₀)를 나타냈다.

[0027] 항산화 활성은 DPPH 자유 라디칼 소거 효과를 기초로 측정하였다. 화합물 1, 2, 3 및 4는 각각 3.8, 3.9, 1.0 및 7.0 μ M의 IC₅₀ 값을 갖는 강한 DPPH 라디칼 소거능을 나타내며, 이는 대표적인 항산화 물질인 L-아스코르브산(IC₅₀, 20 μ M)보다 훨씬 더 강한 활성을 발현하는 것이다.

산업상 이용가능성

[0028] 본 발명의 포마 헤르바룸으로부터 분리된 신규 화합물은 뛰어난 항산화 활성을 갖는 특징이 있어 산화 손상에 의해 발생하는 질환의 치료에 효과적이므로, 생물 의학 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

수탁번호

[0029]

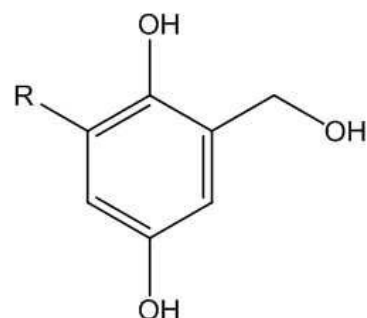
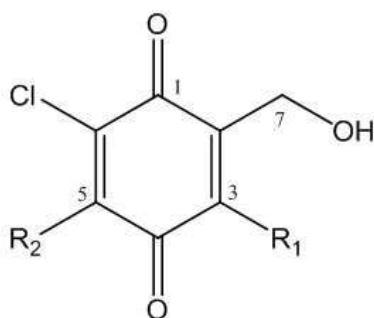
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC93091

수탁일자 : 20100409

도면

도면1



브로모클로로젠티실퀴논 A (1): R₁=Br, R₂=H

브로모클로로젠티실퀴논 B (2): R₁=H, R₂=Br

클로로젠티실퀴논 (5): R₁, R₂=H

클로로젠티실 알코올 (3): R=Cl

젠티실 알코올 (4): R=H