

Tetraselmis suecica 유래의 항산화성 물질의 정제 및 구조김세권⁺ · 변희국 · 박표잠 · Kyoko Adachi*
부경대학교 화학과, *일본 해양생물공학연구소**Purification and Structure of Antioxidative Substance
Derived from *Tetraselmis suecica***Se-Kwon KIM⁺, Hee-Guk BYUN, Pyo-Jam PARK and Kyoko ADACHI*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*Marine Biotechnology Institute, Shimizu Laboratories, Shizuoka 424-19, Japan

Tetraselmis suecica (*T. suecica*) of Prasinophyta was selected because the growth rate is comparatively higher and the culturing is also easy. In order to investigate antioxidative activity, the soluble elements of *T. suecica* were fractionated using water and organic solvents such as methanol, hexane, chloroform, ethylacetate and butanol. The chloroform fraction of *T. suecica* showed strong antioxidative activity. The potential antioxidative activity was detected in hexane:ethylacetate (1:5) once used the fractions by different mixtures of organic solvents. This fraction was further purified by preparative thin layer chromatography (PTLC) and repeated reverse-phase HPLC. On the basis of chemical and spectroscopic evidences obtained by UV, FT-IR, FAB-MS and NMR, the compound purified from *T. suecica* was identified as pheophorbide-a. The antioxidative activity of the compound was comparable to that of α -tocopherol and could be act as an antioxidant in foods.

Key words: Marine microalgae, *Tetraselmis suecica*, Antioxidative activity, Pheophorbide-a

서 론

해양 미세조류는 광합성에 의해 에너지원이 되는 단백질, 지질, 당질 등을 생합성하므로 영양원으로써 해양 생태계의 먹이사슬과 관련된 동·식물의 생명현상을 좌우하는 중요한 생물군으로 분류되어 해양생태계에서의 역할은 매우 중요하다고 할 수 있다.

최근 해양생물자원에 대한 중요성이 부각되면서 어류, 패류, 갑각류 및 해조류를 대상으로 식품, 기능성 식품, 의약품, 의약품첨가물 및 화장품 분야에서 신소재를 개발하기 위한 연구가 폭넓게 이루어지고 있다. 특히, 해조류 중에서 미세조류는 1차 생산자인 미이용 해양자원으로서 그 다양성과 풍부함으로 인해 생물자원화, 생리활성물질의 탐색에 의한 기능성 소재 및 의약품 개발, 이산화탄소 감소와 폐수처리 등의 환경오염문제의 해결 등 환경친화적 생물산업으로까지 발전이 기대되고 있다.

미세조류는 1970년대에 인공적으로 배양되어 그 이용방법이 제기되었으며 (Goldman, 1979), 현재까지 미세조류의 단백질 및 지질에 관한 연구는 식량자원으로써 뿐만 아니라 동물사료로도 활용하기 위하여 이루어져 왔다 (Fabregas and Herrero, 1985; Menzel and Wild, 1989; Volkman et al., 1989; Yongmanitchai and Ward, 1991; Alonso et al., 1992; Servel et al., 1994; Viso and Marty, 1993). 또한, 미세조류의 천연색소에 관한 연구는 carotenoid 중에서 β -carotene을 중심으로 수행되었으며, 미세조류에 널리 분포하고 있는 carotenoid류인 zeaxanthin, β -carotene, lutein, fucoxanthin 등은 free radical 및 hydroxyl radical을 소거할 수 있는 물질로 보고된 바 있다 (Miki, 1991).

한편, 미세조류로부터 고부가가치의 건강보조식품 및 의약품 소재 개발에 관한 연구는 인체에 대한 안전성을 확보하기 위해 유독 성분 분석 (Tsuda et al., 1964; Tsien et al., 1975; Kao, 1983; Nakamura and Yasumoto, 1985), 항균 및 항곰팡이성 (Murakami et al., 1988; Kita and Fukuyo, 1988), 항종양성 (Moore et al., 1996; Gustafson et al., 1989) 효소저해 (Cannell et al., 1987; 1988; Lincoln et al., 1991) 및 항산화성 (Miki, 1991; Le Tutour et al., 1998) 물질의 탐색에 대해 이루어졌다.

이러한 생리기능성 연구 중에서 항산화성 물질에 관한 연구는 최근 노령화 인구의 증가와 더불어 그 중요성이 높아지고 있다. 인체의 노화와 발암의 원인이 되는 산소 및 산화물 라디칼의 소거제로 현재 사용되고 있는 항산화제는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG) 및 tert-butyl hydroquinone (TBHQ) 등이 있으나 합성 항산화제로 인한 안전성 문제로 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 현재 미세조류에 대한 생리학적 및 영양학적인 연구와 항산화성에 관한 연구가 이루어지고 있지만 미세조류의 다양성 만큼 폭넓게 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구에서는 미세조류 중에서 대량 배양이 용이한 담녹조류 (Prasinophyta)인 *Tetraselmis suecica* (*T. suecica*)을 선정하여 조체로부터 항산화성 물질을 추출하고, 분리정제하여 그 물질의 화학적 구조를 밝혀 항산화제로서의 이용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용된 미세조류는 해양에서 서식하는 담녹조류인

⁺Corresponding author: sknkim@mail.pknu.ac.kr

*T. suecica*를 부경대학교 수산과학연구소의 한국해양미세조류은행으로부터 분양받아 20 L까지 F/2배지를 이용하여 20°C, 30 PPT, 6000 Lux 하에서 배양하였다. 배양한 후 원심분리하여 미세조류를 수거하였으며, 이것을 동결건조하여 분석시료로 하였다.

항산화성 물질을 분리 및 정제하기 위한 분석용 thin layer chromatography (TLC) plate와 분취용 TLC plate는 Merck사의 precoated Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하였으며, silica gel은 Merck사의 Kieselgel 60을 사용하였다. High performance liquid chromatography (HPLC)용 column은 Shiseido사의 Capcell Pak C₁₈ (φ 4.6×250 mm)을 사용하였으며, 모든 용매는 특급 시약을 사용하였다.

2. 항산화성 측정

2.1. Radical scavenging activity (RSA) 측정

RSA는 Hatano et al. (1988)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 각 희분별로 일정한 농도가 되도록 methanol 2 mL에 녹이고 이를 1.5×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)/methanol 용액 0.5 mL와 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 RSA 값을 계산하였다. 대조구는 시료용액 대신에 2 mL의 methanol을 넣어 시료용액과 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다. RSA 값은 실험한 값의 평균값으로 나타내었다.

$$\text{RSA (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.2. Inhibition Concentration (IC₅₀) 값의 측정

최종 활성물질을 1~20 µg/mL 농도가 되게 methanol 2 mL에 녹여 1.5×10^{-4} M DPPH/methanol 용액 0.5 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서 흡광도로 RSA 값을 구하여 대조구의 흡광도에 대해 50% 흡광도 감소를 나타내는 시료의 농도를 IC₅₀으로 표시하였다. IC₅₀값은 실험한 값의 평균값으로 나타내었다.

3. 항산화성 물질의 추출 및 분리·정제

동결건조한 *T. suecica* 50 g에 3배 가량의 methanol을 가하여 80°C에서 2시간 동안 환류 냉각하면서 2회 추출 여과한 후, 감압 건조하여 methanol 추출물로 하였다. Methanol 추출물은 10% methanol 용액에 부유시킨 후, Fig. 1과 같이 hexane, chloroform, ethylacetate 그리고 butanol로 계통 분획하여 얻은 지용성 희분을 감압 건조하였으며, 물층인 수용성 희분은 동결건조하여 분리·정제에 사용하였다.

지용성 희분과 수용성 희분 중 DPPH radical 소거능이 가장 좋은 희분을 시료로 사용하였다. 시료량의 약 50배 정도의 silica gel을 충전시킨 open column (φ35×300 mm)에 시료를 주입한 후, hexane, hexane:ethylacetate (5:1), hexane:ethylacetate (1:1), hexane:ethylacetate (1:5), ethylacetate, dichloromethane:methanol (10:1), dichloromethane:methanol (5:1), methanol 순으로 용리시켜 8가지의 조추출물을 얻었다.

상기에서 추출된 8가지의 조추출물 중에서 DPPH radical 소거

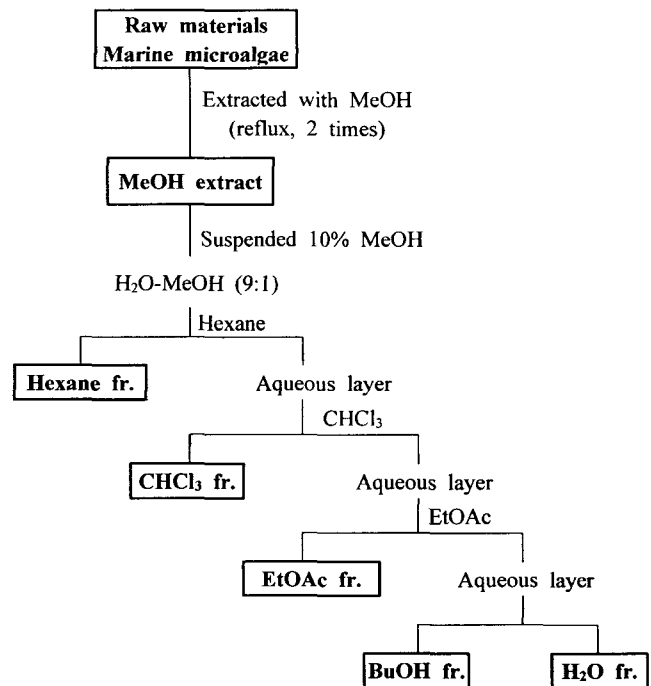


Fig. 1. Flow diagram for extraction of antioxidative fractions from the marine microalgae.

능이 가장 좋은 희분을 분리정제용 시료로 사용하였다. 활성이 가장 좋은 시료를 약 5~10% 용액으로 조제하여 PTLC plate (10×20 cm)에 capillary syringe를 사용하여 시료를 band 형태로 주입시킨 후 전개용매로 hexane:acetone (7:3)을 사용하여 전개한 다음, 용매를 완전히 건조시키고 UV lamp (254 nm)로 흡수대를 확인하였다. 분리된 각 band들을 긁어모아 chloroform:methanol (1:1) 용매를 사용하여 흡착되어 있는 시료를 완전히 용출시킨 다음 여과한 후 감압 건조하여 8개의 희분을 얻었다. PTLC 활성 희분은 2차로 PTLC plate에 band 형태로 주입시켜 전개용매 chloroform:methanol:acetonitrile (8:1:1)을 사용하여 전개한 다음 상기와 같은 방법으로 활성희분을 얻었다.

2차 PTLC로 전개된 희분 중에서 가장 좋은 활성을 가진 희분을 감압 건조하여 chloroform:methanol (1:1) 용매에 녹여 HPLC에서의 시료용액으로 사용하였다. HPLC에서 C₁₈ column을 사용하였으며, 이동상은 50% methanol과 acetonitrile를 이용하여 농도구배법 (50~100% acetonitrile, 60 min)으로 용출된 희분 중에서 DPPH radical 소거능이 가장 높은 희분을 HPLC로 재분획하여 단일 희분을 얻었다.

4. 구조분석

*T. suecica*에서 분리·정제된 항산화성 물질의 구조는 NMR (Varian Unity 500, MA, USA), FAB-MS (JEOL JMS-SX102, MA, USA), FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 2000, MA, USA) 및 UV (Varian Cary 1C, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 즉, NMR 스펙트럼은 정제된 시료를 800 µL CDCl₃에 녹여 sampling tube (Kusano Kagakukikai Co., LTD., Tokyo, Japan)에 넣어 용

액의 높이가 약 5.2 cm가 되도록 한 후 sampling tube를 NMR 분석 hold에 넣어 frequency 500 MHz로 분석하여 얻었다.

FAB-MS 스펙트럼은 정제된 시료를 methanol에 녹여 일정량을 취하여 시료주입장치에 주입한 후 분석하여 얻었다. IR 스펙트럼은 KBr pellet와 시료 KBr pellet (시료 2 mg과 KBr 200 mg을 혼합)를 만들어 FT-IR로 분석하여 얻었다. UV 스펙트럼은 ethanol에 시료를 녹여 만든 용액을 모든 UV과장에서 흡광도를 측정하여 얻었다.

결과 및 고찰

1. 항산화성 물질의 추출 및 분리·정제

미세조류 *T. suecica*의 수용성 및 지용성 추출물들의 항산화성은 DPPH radical 소거능 방법으로 측정하여 DPPH radical을 50% 소거시키는 시료 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다 (Table 1). *T. suecica*의 수용성 추출물은 DPPH radical 소거능이 $400 \mu\text{g/mL}$ 이상이었으며, 지용성 획분의 경우는 chloroform, ethylacetate 및 hexane 획분에서 각각 $55 \mu\text{g/mL}$, $118 \mu\text{g/mL}$ 및 $148 \mu\text{g/mL}$ 로 chloroform 획분의 DPPH radical 소거능이 가장 높게 나타났다.

Table 1. Comparison of antioxidative activities between extracts of *T. suecica*

| Fractions | IC_{50} * ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------|----------------------------------|
| MeOH | 166 |
| Hexane | 148 |
| CHCl_3 | 55 |
| EtOAc | 118 |
| BuOH | 300 |
| H_2O | >400 |

*Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min. Values are means of three experiments.

Choi et al. (1993)은 해조류 18종의 methanol 추출물이 갖는 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 대부분 $480 \mu\text{g/mL}$ 이상이었으나 *Ecklonia stolonifera*와 *Symphicoladia latiuscula*는 각각 $68.8 \mu\text{g/mL}$ 및 $54.2 \mu\text{g/mL}$ 이었다고 보고하였다. 또한 Le Tutour et al. (1998)은 vitamine E와 5종의 갈조류 추출물에 대한 항산화성의 상승효과를 측정한 결과, 5종 모두 13~45% 범위 내에서 상승작용이 있어 해양성 조류에 항산화성이 있음을 확인하였다.

본 연구에서 DPPH radical 소거능이 가장 높은 물질은 *T. suecica*의 chloroform 획분으로 미세조류의 종은 다르지만 Choi et al. (1993)이 보고한 값과 거의 유사하였다. 따라서 *T. suecica*의 유기용매 추출물 중에서 chloroform 추출물을 정제용으로 사용하였다.

미세조류 *T. suecica*의 chloroform 추출물은 silica gel column chromatography에서 8개의 획분으로 분리하여 감압 건조하였으며, 각 획분의 농도 $80 \mu\text{g/mL}$ 로 측정된 RSA 값은 Fig. 2에 나타내었다. 소수성이 강한 획분인 C1 (hexane)과 그 혼합용매 중에서 C4 (hexane:ethylacetate, 1:5)의 RSA 값은 80% 이상으로 높게

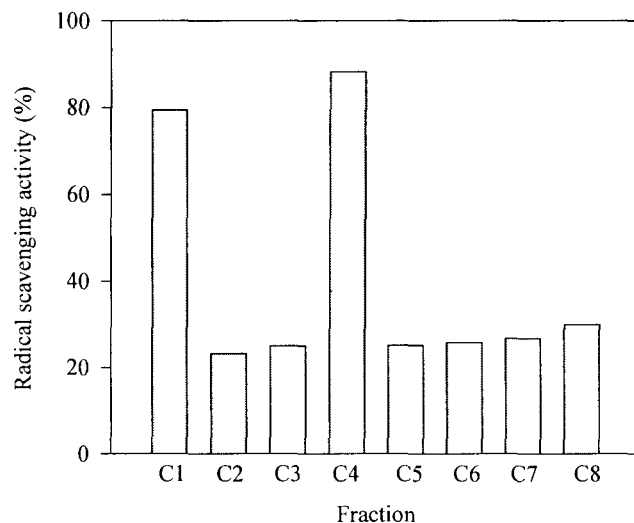


Fig. 2. Radical scavenging activity (RSA) of fractions further isolated from chloroform fraction of *T. suecica* with various mixed solvent system. RSA values for each fractions were measured at a concentration of $80 \mu\text{g/mL}$. C1, hexane; C2, hexane:ethylacetate (5:1); C3, hexane:ethylacetate (1:1); C4, hexane:ethylacetate (1:5); C5, ethylacetate; C6, chloroform:methanol (10:1); C7, chloroform:methanol (5:1); C8, methanol.

나타났으며, 혼합용매의 친수성을 높여 용출시켜 얻은 획분 C5~C8은 모두 30% 이하로 소수성 혼합용매로 용출된 획분에 비해 낮게 나타났다. 이들 8개의 획분 중에서 hexane:ethylacetate (1:5)로 용출시킨 획분 C4가 DPPH radical 소거능이 가장 높아 다음 정제과정으로 PTLC를 수행하였다.

획분 C4는 PTLC에서 전개용매 (hexane:acetone, 7:3)로 전개시킨 결과 8개의 획분으로 분리되었으며, 분획물은 chloroform:methanol (1:1) 용매로 용출한 후 감압 건조하여 각 획분의 농도가 $40 \mu\text{g/mL}$ 되도록 하여 RSA 값을 측정하였다 (Fig. 3). PTLC 획분 중에서 가장 활성이 좋은 T5 획분은 다시 전개용매 (chloroform:methanol:acetonitrile, 8:1:1)로 PTLC하여 3개의 획분으로 분리되었으며, 각 분획물 $20 \mu\text{g/mL}$ 으로 RSA를 측정한 결과 획분 T₅₂의 항산화 활성이 가장 높게 나타났다 (Fig. 4).

PTLC에서 분리한 획분 중 가장 활성이 좋은 T₅₂ 획분은 C₁₈ column이 장치된 HPLC를 사용하여 50% methanol과 acetonitrile을 용리액으로 하여 직선상 농도구배법 (50~100% acetonitrile, 60 min)에 의해 유속 1.0 mL/min 로 용리하여 최종적으로 단일 획분을 얻었다 (Fig. 5). HPLC로 정제된 항산화성 물질과 시판 항산화제인 α -tocopherol, BHT 및 BHA의 IC_{50} 값은 Table 2에 비교하여 나타내었다. 정제된 항산화성 물질의 IC_{50} 값은 $10.2 \mu\text{g/mL}$ 로 합성 항산화제인 BHT ($3.4 \mu\text{g/mL}$) 및 BHA ($1.8 \mu\text{g/mL}$) 보다는 활성이 낮았지만 천연 항산화제인 α -tocopherol ($9.8 \mu\text{g/mL}$)과 비교될 수 있었다. 이와 같이 정제된 화합물은 천연 항산화제로 가장 널리 이용되고 있는 α -tocopherol과 거의 같은 정도의 항산화활성을 나타내었다.

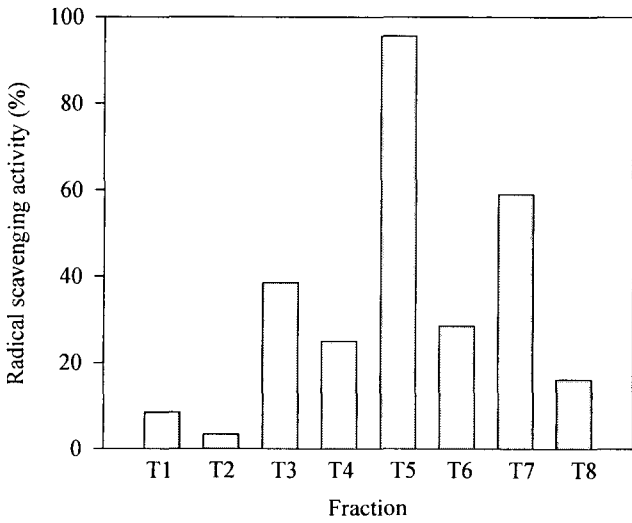


Fig. 3. RSA of PTLC fractions of C4 fraction isolated with hexane:ethylacetate (1:5). Developing solvent used hexane:acetone (7:3), and bands were identified by the UV-lamp of 254 nm. RSA values for each fractions were measured at a concentration of 40 µg/mL.

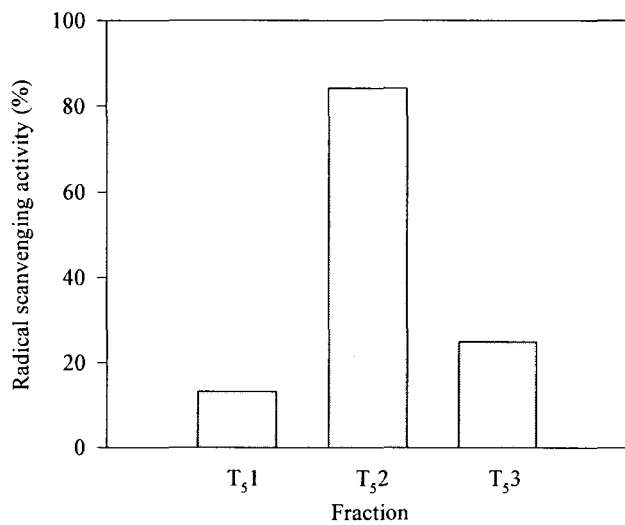


Fig. 4. The radical scavenging activity of second PTLC fractions of active fraction T5 obtained by PTLC. Developing solvent used chloroform:methanol:acetonitrile (8:1:1), and bands were identified by the UV-lamp of 254 nm. RSA values for each fractions were measured at a concentration of 20 µg/mL.

2. 항산화성 화합물의 구조결정

미세조류 *T. suecica*의 chloroform 추출물로부터 분리·정제된 항산화성 물질의 성상은 짙은 남색이며, TLC상에서 전개용매 hexane:acetone (7:3)으로 전개한 결과, Rf 값이 0.40으로 나타났다. 이 물질의 구조를 분석하기 위하여 FT-IR, UV, FAB-MS 및 NMR를 이용하여 측정하였으며, 이들 결과를 종합적으로 검토하여 구조를 결정하였다. 이 화합물의 UV spectrum의 최대 흡광도는 ethanol 용매에서 λ_{max} 값이 667 nm로 확인되었으며, 분자량은

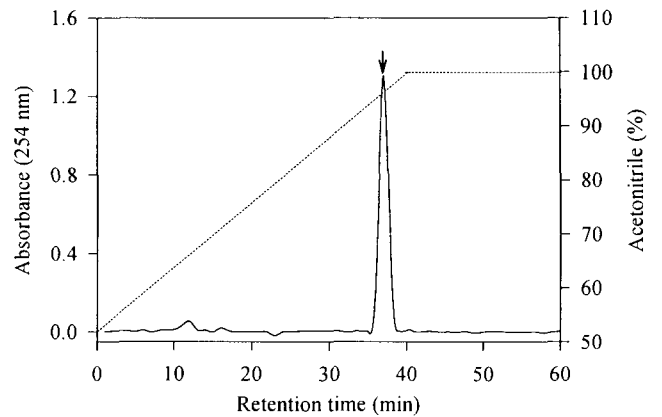


Fig. 5. Reverse-phase HPLC chromatogram of active fraction T_{3,2}. HPLC operation was carried out with linear gradient 50% methanol and acetonitrile as mobile phase at 0.6 mL/min of a flow rate using UV detector at 254 nm.

Table 2. The radical scavenging effect of the purified compound on DPPH radical

| Samples | IC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL) |
|-------------------|--|
| α-Tocopherol | 9.8 |
| BHT ²⁾ | 3.4 |
| BHA ³⁾ | 1.8 |
| Compound | 10.2 |

¹⁾Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min,

²⁾Butylated hydroxy toluene,

³⁾Butylated hydroxy anisole,

Values are means of three experiments.

FAB-MS로 측정된 결과, m/z 593에서 molecular peak를 확인할 수 있었다. 그리고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) spectrum (Table 3)을 분석하여 구조를 확인한 결과, 분자식이 C₃₃H₃₆N₄O₅인 pheophorbide-a로 동정되었으며, 이것은 pheophorbide-a와 관련된 연구보고 (Ma and Dolphin, 1996; Korth et al., 1998; Ruckmann et al., 1999)에서 비교하여 확인할 수 있었다.

Pheophorbide-a는 chlorophyll-a가 산성조건하에서 chlorophyllase의 작용에 의해 phytyl기와 Mg²⁺ 이온이 제거된 구조이며 (Yang et al., 2000), 암 증양을 광 역학적으로 치료하는데 있어서 광 센스로 활용하기 위한 연구가 수행되어져 왔다 (Roder et al., 1990; Aprahamian et al., 1993; Roder et al., 1999). 이것은 광 세포독성제로서 조직배양에서 쥐의 골수종 세포와 사람의 방광암 세포에 대해 광 세포독성을 유발시키는 것으로 보고되어 있다 (Chernomorsky et al., 1984; Segelman et al., 1987). Pheophorbide-a나 방사선으로 세포를 처리하면 세포표면의 수용체들이 항체 및 cytokine과의 일련의 결합성질이 바뀌게 된다. 이와 같은 광 역학적인 작용에 의해 세포는 세포의 신호전달이 어렵게 되어 결과적으로 세포의 기능장애, 세포독성 및 세포사멸을 초래하게 된다 (Gliński et al., 1995). 따라서 목적으로 하는 세포에 pheophorbide-a의 유입이나 lysosome에 지속적으로 유입되어 광 역학적인

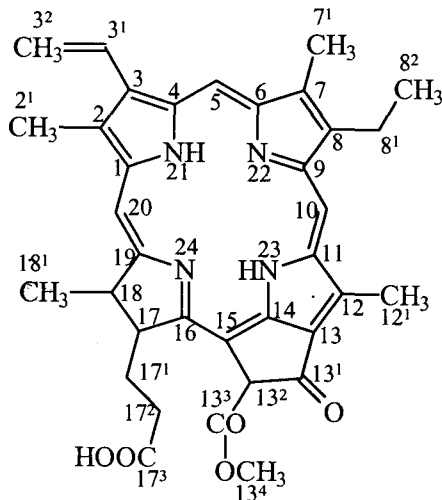


Fig. 6. The chemical structure of pheophorbide-a purified from *T. suecica*.

작용에 의해 종양세포를 사멸시킬 수 있다고 보고하였다 (Bergstrom et al., 1994).

한편, Nakamura et al. (1996)은 pheophorbide-a가 지질과산화물의 생성을 약 71% 억제하였으며, 이것의 항산화성은 소수성 항산화제로 알려진 α -tocopherol보다는 약간 낮았다고 보고하였다. 또한, pheophorbide-a의 구리복합체인 Cu · pheophorbide-a의 항암활성은 pheophorbide-a와 거의 같았지만 항산화활성은 매우 낮았다고 하였다. Pheophorbide-a의 전구체인 chlorophyll-a와 관련된 화합물의 항산화 활성은 보고되어 있으며 (Endo et al., 1985; Sato et al., 1986; Sakata et al., 1990), 특히 chlorophyll-a에서 Mg²⁺ 이온이 제거된 pyropheophytin-a는 α -tocopherol보다도 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고된 바 있다 (Cahyana et al., 1992).

이들 연구결과에서와 같이 본 연구에서도 *T. suecica* 유래의 pheophorbide-a의 항산화성은 α -tocopherol과 비교할 수 있을 정도로 거의 같은 결과를 나타내었다. 해양에서 대량 생산이 가능한 미세조류인 *T. suecica*로부터 분리정제된 항산화성 물질은 pheophorbide-a로 동정되었다.

요 약

해양 미세조류는 해양생물의 영양원으로서 대부분 소비되고 있으며, 그 종류도 매우 다양하다. 이들 미세조류로부터 유용물질의 회수 및 이용은 미이용 수산자원의 효율적 이용과 아울러 생물 및 식량자원으로서 그리고 새로운 기능성 소재로서 활용될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 이러한 해양 미세조류의 효율적인 이용을 위하여 비교적 성장이 빠르고 배양이 용이한 담녹조류인 *T. suecica* 중의 항산화성 물질을 분리정제하여 구조를 결정하였다.

미세조류 *T. suecica*의 유기용매 추출물 중의 항산화성은 chloroform 획분이 가장 좋았으며, 이 획분을 silica gel column chromatography, PTLC 및 HPLC를 사용하여 항산화성 물질을 분리·정제하였다. Silica gel column을 사용하여 분리된 획분의 항

Table 3. ¹H and ¹³C NMR assignments of antioxidative compound purified from *T. suecica*

| Positions | Chemical shift (ppm) | |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| | ¹ H δ | ¹³ C δ |
| 1 | | 151.81 |
| 2 | | 147.33 |
| 2 ¹ | 3.68 (s) | 11.75 |
| 3 | | 135.12 |
| 3 ¹ | 11.40 (s) | 189.54 |
| 3 ² | 9.20 (s) | 180.50 |
| 4 | | 146.36 |
| 5 | 10.20 (s) | 104.41 |
| 6 | | 152.55 |
| 7 | | 136.31 |
| 7 ¹ | 3.33 (s) | 11.39 |
| 8 | | 145.13 |
| 8 ¹ | 3.86 (q, 7.6) | 20.12 |
| 8 ² | 1.73 (t, 7.6) | 18.12 |
| 9 | | 148.64 |
| 10 | 9.8 (s) | 107.8 |
| 11 | | 150.35 |
| 12 | | 136.63 |
| 12 ¹ | 3.65 (s) | 12.89 |
| 13 | | 133.04 |
| 13 ¹ | | 190.50 |
| 13 ² | 6.28 (s) | 66.47 |
| 13 ³ | | 171.33 |
| 13 ⁴ | 3.83 (s) | 52.84 |
| 14 | | 162.68 |
| 15 | | 107.04 |
| 16 | | 158.60 |
| 17 | 4.25 (m) | 52.05 |
| 17 ¹ | 2.63, 2.46 (m) | 30.64 |
| 17 ² | 2.48, 2.21 (m) | 31.37 |
| 17 ³ | | 173.45 |
| 18 | 4.63 (qd, 7.1, 1.8) | 49.80 |
| 18 ¹ | 1.82 (d, 7.1) | 24.25 |
| 19 | | 168.34 |
| 20 | 8.81 (s) | 95.36 |

산화성은 hexane:ethylacetate (1:5)로 용출시킨 획분에서 가장 높았다. 이 획분은 PTLC에 전개하여 8개의 획분을 얻었으며, 그 중에서 Rf값 0.40인 획분에서 활성이 높게 나타났다. HPLC에서 단일 획분으로 정제된 물질의 항산화성은 IC₅₀ 값으로 10.2 μ g/mL였으며, 화학적으로 합성된 항산화제인 BHT 및 BHA보다는 낮았지만 천연 항산화제인 α -tocopherol과 비교될 수 있었다. 이 물질의 화학적 구조는 chlorophyll을 전구체로 하는 pheophorbide-a로 동정되었으며, 항산화 활성은 α -tocopherol과 비교될 수 있어 식품 및 관련분야에서 항산화제로서 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단에서 시행한 대학부설연구소과제(관리번호, 1996-005-H0337) 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해 준 한국학술진흥재단에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Alonso, L., E.M. Grima, J.A.S. Perez, J.L.G. Sanchez and F.G. Camacho. 1992. Fatty acid variation among different isolations of a single strain of *Isochrysis galbana*. *Phytochemistry*, 31, 3901~3904.
- Aprahamian, M., S. Evrard, P. Keller, M. Tsuji, G. Balboni, C. Damge and J. Marescaux. 1993. Distribution of pheophorbide-a in normal tissues and in experimental pancreatic cancer in rats. *Anti-Cancer Drug Design*, 8, 101~114.
- Bergstrom, L.C., I. Vucenik, I.K. Hagen, S.A. Chernomorsky and R.D. Poretz. 1994. In-vitro photocyctotoxicity of lysosomotropic immunoliposomes containing pheophorbide-a with human bladder carcinoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 24, 17~23.
- Cahyana, A.H., Y. Shuto and Y. Kinoshita. 1992. Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, Arame (*Eisenia bicyclis*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1533~1535.
- Cannell, R.J.P., S.J. Kellam, A.M. Owsianka and J.M. Walker. 1987. Microalgae and cyanobacteria as a source of glycosidase inhibitors. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1701~1705.
- Cannell, R.J.P., S.J. Kellam, A.M. Owsianka and J.M. Walker. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica*, 56, 10~14.
- Chernomorsky, S.A., R.D. Poretz and A.B. Segelman. 1984. The photodynamic effect of chlorophyll derivatives on murine myeloma cells in tissue culture. *Photochem. Photobiol.*, 39, 49S.
- Choi, J.S., J.H. Lee, H.J. Park, H.G. Kim, H.S. Young and S.I. Mun. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *prunus davidina*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 24, 299~303.
- Endo, Y., R. Usuki and T. Kaneda. 1985. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 1375~1378.
- Fabregas, J. and C. Herrero. 1985. Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 23, 110~113.
- Glinski, J.A., E. David, T.C. Warren and G. Hansen. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide a, a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochem. Photobiol.*, 62, 144~150.
- Goldman, J.C. 1979. Outdoor algal mass cultures-I. Applications. *Water Res.*, 13, 1~19.
- Gustafson, K.R., J.H. Cardellina II, R.W. Fuller, O.S. Weislow, R.F. Kiser, K.M. Snader, G.M. Patterson and M.R. Boyd. 1989. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer. Inst.*, 81, 1254~1258.
- Hatano, T., H. Kagawa and T. Okawa. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice wet: their relative astringency and radical scavenging effect. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2090~2097.
- Kao, C.Y. 1983. New perspective on the interactions of tetrodotoxin and saxitoxin with excitable membranes. *Toxicon Suppl.*, 3, 211~219.
- Kita, T. and Y. Fukuyo. 1988. Description of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium hiranoi* sp. nov. inhabiting tidepools on Japanese Pacific Coast. *Bull. Plank. Soc. Jap.*, 35, 1~7.
- Korth, O., T. Hanke and B. Roder. 1998. Photophysical investigations of Langmuir-Blodgett mono- and multilayer films of pheophorbide-a. *Thin Solid Films*, 320, 305~315.
- Le Tutour, B., F. Benslimane, M.P. Gouleau, J.P. Gouygou, B. Saadan and F. Quemeneur. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.*, 10, 121~129.
- Lincoln, R.A., K. Strupinski and J.M. Walker. 1991. Enzyme inhibitors from algae. *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 429S.
- Ma, L. and D. Dolphin. 1996. Nucleophilic reaction of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene and 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene with methyl pheophorbide-a unexpected products. *Tetrahedron*, 52, 849~860.
- Menzel, K. and A. Wild. 1989. Fatty acid composition in the lipids of some marine *Chlorococcales* and *Eustigmatales*. *Z. Naturforsch. Sect. C. Biosci.*, 44, 9~10.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63, 141~146.
- Moore, R.E. 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. *J. Indust. Microbiol.*, 16, 134~143.
- Murakami, M., K. Makabe, S. Okada, K. Yamaguchi and S. Konosu. 1988. Screening of biologically active compounds in microalgae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1035~1039.
- Nakamura, M. and T. Yasumoto. 1985. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon*, 23, 271~276.
- Nakamura, Y., A. Murakami, K. Koshimizu and H. Ohigashi. 1996. Identification of pheophorbide a and its related compounds as possible anti-tumor promoters in the leaves of *Neptunia oleracea*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1028~1030.
- Roder, B., D. Nather, T. Lewald, M. Barune, C. Nowak and W. Freyer. 1990. Photophysical properties and photodynamic activity of some tetrapyrroles in vivo. *Biophys. Chem.*, 35, 302~312.
- Roder, B., T. Hanke, S. Oelckers and C. Symietz. 1999. Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 44, 37~44.
- Ruckmann, I., A. Zeug, T. Von Feilitzsch, and B. Roder. 1999. Orientational relaxation of pheophorbide-a molecules in the ground and in the first excited state measured by transient dichroism spectroscopy. *Optics Communications*, 170, 361~372.
- Sakata, K., K. Yamamoto, H. Ishikawa, A. Yagi, H. Etoh and K. Ina. 1990. Chlorophyllone-a, a new pheophorbide-a related compound isolated from *Ruditapes philippinarum* as an antioxidative compound. *Tetrahedron Lett.*, 31, 1165~1168.
- Sato, M., I. Fujimoto, T. Sakai, T. Aimoto, R. Kimura and T. Murata. 1986. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX. On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 2428~2434.
- Segelman, A.B., I.K. Hagen, S.A. Chernomorsky, K. Weadock and G. H. Sigel. 1987. Highly purified pheophorbide-a as a photosensitizer in human bladder cancer in vitro. In *New Direction in Photodynamic Therapy*, D.C. Nechers, ed., SPIE, Bellingham, pp. 205~209.
- Servel, M.O., C. Claire, A. Derrien, and L. Coiffard. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36, 691~693.
- Tsien, R., D.P.L. Green, S.R. Levinson, B. Rudy and J.K.M. Sanders.

1975. A pharmacologically active derivative of tetrodotoxin. Proc. R. Soc. Lond. B., 191, 555~559.
- Tsuda, K., S. Ikuma, M. Kawamura, R. Tachikawa, K. Sakai, C. Tamura and O. Amakasu. 1964. Tetrodotoxin. VII. On the structures of tetrodotoxin and its derivatives. Chem. Pharm. Bull., 12, 1375~1374.
- Viso, A.C. and J.C. Marty. 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. Phytochemistry, 34, 1521~1533.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers and C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 128, 219~240.
- Yang, H.Y., Z.Y. Zhang, Z.H. Han and S.D. Yao. 2000. An investigation of the triplet state of pheophorbide-a using laser flash photolysis. Dyes and Pigments, 46, 139~143.
- Yongmanitchai, W. and O.P. Ward. 1991. Screening of algae for potential alternative source of eicosapentaenoic acid. Phytochemistry, 30, 2963~2967.

2001년 12월 4일 접수

2002년 3월 18일 수리