

해조류 추출물의 라디칼 소거활성 검색과 보라우무의 항산화활성 성분

박기의¹, 이희정², 서영완^{1*}

^{1*} 한국해양대학교 해양과학부

² 한국해양대학교 해양과학기술연구소

Abstract

The antioxidant activities of methanol and dichloromethane/acetone extracts of twenty three seaweeds were tested by using 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) at a 100 μ g/ml concentrations. The dichloromethane/acetone extracts of three seaweeds(*Symphyclocladia latiuscula*, *Gloiopoltis furcata*, *Sagassum thunbergii*) were found to be most effective in DPPH radical scavenging activity. The DPPH radical scavenging effect of these seaweeds was *Symphyclocladia latiuscula*(85.82%), *Gloiopoltis furcata*(82.83%), *Sagassum thunbergii*(74.05%) in order. These seaweeds were evaluated using the pyrogallol UV-VIS spectrophotometric method to generate superoxide anion. Among them, the methanol extracts of six seaweeds were showed weak superoxide dismutase-like activities. The dichloromethane/acetone extracts obtained from *Symphyclocladia latiuscula* was fractionated with CH₂Cl₂, *n*-hexane, 15% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O. The 15% aq.MeOH soluble fraction exhibiting the strongest antioxidative activities was further purified by C18 column flash chromatography and reversed HPLC. The two active principles of *Symphyclocladia latiuscula* were isolated and characterized as 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol(1), 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether(2).

1. 서론

생체 내에서 산화와 관련된 현상으로 인식되고 있는 노화의 원인 중에 하나로 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등을 포함한 활성산소의 역할이 대두되어 이들에 대한 관심이 매우 높아지고 있다¹. 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 free radical에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 free radical에 의한 과산화 반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노

화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하며 발암과정에도 관여한다^{2,3}. 따라서 과일과 채소에 많은 phenolic 화합물, flavone 유도체, 토코페롤, 아스코르브산, 셀레늄과 같은 항산화물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며 암 심장 혈관계 질환등을 예방 지연시킴으로써 노화방지에도 중요한 역할을 한다^{4,5}. 해양생물은 현재까지 탐색된 생물의 수가 전체 해양 생물의 10%에도 미치지 못하고 있고, 해양이라는 특수 환경에 서식하기 때문에 육상생물과는 다른 대사물질을 만들 가능성이 높다. 본 연구에서는 23여종의 해조류 추출물에 대한 DPPH radical 소거능과 pyrogallol의 자동산화 반응 억제 효과를 이용한 SOD 유사활성을 검색하여 항산화활성을 탐색하고 그 원인 물질을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용한 해조류는 경남 기장군과 영도 중리에서 2002년 2~3월 중에 채집하였다.

2.2 시료 추출물 및 각 분획물 제조

채집한 해조류는 민물로 표면의 염분을 제거한 후 저온열풍건조기(30-40℃)로 건조한 다음 추출관에 넣고 48시간 동안 CH₂Cl₂와 Acetone 혼합 용매로 추출한 다음 MeOH로 순차적으로 추출하였다. 각 시료에 대한 용매 추출물은 회전 진공 농축기(EYELA, N-N series)로 감압 농축시켜 용매를 제거하고 각각의 농축물을 얻었다.

보라우무의 CH₂Cl₂/Acetone 추출물(1.9787g)은 CH₂Cl₂, *n*-Hexane(0.2594g) 15% aqueous MeOH(0.8852g), *n*-BuOH(0.0644g), H₂O(0.7697g)로 용매분획하였고 C18 reversed-phase vacuum flash chromatography를 한 후 C18-HPLC를 하여 2종의 화합물을 분리·정제하였다. 그리고 ¹H-, ¹³C-NMR을 측정하고 문헌치⁶와 비교하여 구조를 결정하였다.

2.3 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)에 대한 radical scavenging effect 측정⁷

DPPH 시약 2mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15ml에 녹인 용액 1.2ml에 다시 EtOH 3ml과 DMSO 0.5ml을 혼합한다. 그리고 각 농도별 시료(10μg/ml~100μg/ml) 50μl와 제조한 DPPH용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

대조구 흡광도 - 실험구 흡광도

$$\text{EDA(electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{실험구 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

2.4. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성^{8,9}

각 시료 0.2ml에 pH 8.5로 보정한 Tris HCl bufer 3ml와 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가지고 25°C에서 10분간 방치 후 1N HCl 1ml로 반응 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 해조류의 DPPH를 이용한 free radical scavenging 효과

경남 기장군과 부산 영도 중리에서 23종의 해조류를 채집하여 먼저 CH₂Cl₂/Acetone 로 추출한 후 MeOH로 추출하여 각각의 시료 엑스를 얻었다. 이를 대상으로 100µg/ml(final conc.) 농도에서 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical 소거활성을 검색하였다. 실험 결과는 3종의 시료에서 유의성 있는 라디칼 소거활성이 관찰되었다. *Symphocladia latiuscula*(보라우무), *Gloiopeltis furcata*(불등풀가사리), *Sargassum thunbergii*(지충이) CH₂Cl₂/Acetone 추출물에서 L-ascorbic acid(96.64%)의 효과와 필적할 만큼의 각각 85.82%, 82.83%, 74.05%의 효과를 나타내었다. 또한 *Sargassum* sp.(모자반)과 *Symphocladia latiuscula*(보라우무)의 메탄올 추출물에서 63.99%, 56.83%의 DPPH radical 소거 효과가 확인되었다. 이는 합성항산화제로 널리 사용되고 있는 BHT(55.08%)의 효과와 거의 비슷한 free radical 효과를 나타내었다.

3.2 해조류 추출물의 SOD 유사 활성(SOD- like activity)

SOD(superoxide dismutase)는 생체내에서 O₂(Superoxide)소거에 관여하는 효소로서 생성된 활성산소는 생체내에서 산화적 장애를 초래하게 되므로 이런 현상을 억제하는 물질을 찾기 위해 SOD 유사활성에 대한 실험을 23종의 해조류를 대상으로 실험하였다. Superoxide(O²⁻)의 산화 억제 작용을 알아보기 위해 Superoxide와 반응하여 갈변물질을 내는 pyrogallol 자동산화 반응의 억제 정도를 측정하였다. 6종(*Gigartina tenella*(돌가사리), *Colpomenia bullosa*(긴불레기말), *Gloiopeltis furcata*(불등풀가사리), *Halymenia acuminata*(지누아리사촌), *Corallina pilulifera*(작은구슬산호말), *Gymnogongrus flabelliformis*(부챗살))의 메탄올 추출물에서 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 비교적 약한 pyrogallol 자동산화 반응을 억제시키는 것을 확인하였다.

3.3 보라우무 용매분획별 free radical 소거효과

보라우무의 조추출물을 용매분획하여 *n*-Hexane, 15% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fraction으로 나누어 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 100 μ g/ml 농도에서 15% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물의 활성은 각각 89.88% 92.49% 였다. 이는 항산화제인 Vt. E (72.2%), BHT(68.34%)보다 월등히 뛰어난 효과였으며, L-ascorbic acid(96.64%)와 거의 비슷한 소거효과를 나타내었다. 이것으로 보라우무의 항산화 성분은 주로 극성이 큰 화합물에 의한 것임을 추측할 수 있다.

3.4 보라우무에서 분리한 화합물의 항산화 효과

보라우무에서 분리한 2종의 bromophenol 화합물의 DPPH 라디칼을 측정된 결과 화합물 1(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzylalcohol)과 화합물 2(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether)의 IC₅₀은 각각 3.12 μ g/ml과 5.05 μ g/ml였다. 이는 항산화제인 L-ascorbic acid (1.25 μ g/ml), α -tocopherol(6.99 μ g/ml), BHT(87.84 μ g/ml)의 IC₅₀과 비교할 때 보라우무에서 분리한 화합물의 DPPH 라디칼 소거활성이 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 보라우무 조추출물의 항산화 활성은 화합물 1과 화합물 2에 의해 기인됨을 추정할 수 있다.

참고문헌

1. Fridorich L. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201: 875-881
2. Huang MT, Osawa T, Ho CT and Rosen RT. 1994. *Food phytochemicals for cancer prevention I*, 50, 57-57, 71-73. American Chemical Society, Washington
3. Ho CT, Osawa T, Huang MT and Rosen RT. 1994, *Food phytochemicals for cancer prevention II*, 20-31, 155, 183-186, American Chemical Society, Washington
4. G. Papadopoulos and D. Boskou(1991), *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 68, 669-673
5. P. F. Yang and D. E. Pratt(1984), *J. Food Sci.*, 49, 489-492
6. Choi, J. S., Park, H. J., Jung H. A., Chung, H. Y., Jung, J. J., Choi, W. C., 2000, 63, 1705-1706
7. Blois MS. 1958. *Nature*, 26: 1199-1200
8. Marklund. S. Marklund, G., 1974, *Eur. J. Biochem.* 47, 469-473
9. magnani, L., Gaydou, E. M., Hubaud, J. C., *Analytica Chimia Acta*, 411(2000), 200-216