碩士學位論文

해조류의 항산화 활성 검색 및 톳을 이용한 유효성분 분리

濟州大學校 大學院

化 學 科

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

吳 起 林

1997年 12月

해조류의 항산화 활성 검색 및 톳을 이용한 유효성분 분리

指導敎授 李 南 昊

吳 起 林

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

吳起林의 理學 碩士學位 論文으로 認准함

審査委員長 (印)

委 員 (印)

委 員 (印)

濟州大學校 大學院

1997年 12月

Sreening for the Antioxidants from Marine Algae and Separation of Effective Compounds From *Hizikia fusiforme*

Ki-Lim Oh
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER
OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12.

Abstract

Methanol extracts of fourty-six species of marine algae (18 brown algae, 6 green algae, 22 red algae) were examined for antioxidant activity using the Blois' method. Some of them, especially brown algae, showed considerable antioxigenic effect. Trial was made to find the active compound from *Hizikia fusiforme*, edible seaweed abundant in Cheju seashore. Analysis of the non-polar extracts by GC/MSD provides some active components, among which presents Loliolide, a known cytotoxic compound.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목 차

Abstract ····· i
List of table ····· iv
List of figure ····· v

Ⅰ. 서론 ····· 1
Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 5
1. 해조류의 항산화 활성 검색 ····· 5
1) 재료 ····· 5
2) 해조류로 부터 항산화 물질의 추출 및 항산화 활성 측정 ····· 8
2. 톳으로 부터 항산화 물질의 분리 및 동정 ····· 8
1) 항산화 성분의 추출 및 분획 ····· 8
(1) 추출 방법 1 ····· 8
(2) 추출 방법 2 ····· 10
3. 각 분획과 각 추출물의 항산화 활성 측정 ····· 11
4. ODS Cloumn Choromatography에 의한 추출물 중 활성 분획 분리 ··· 11
5. GC/MSD를 이용한 항산화 성분의 확인 ····· 12
Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 13
1. 해조류의 항산화 활성 검색 ····· 13
2. 각 추출물과 각 분획에 대한 항산화 활성 ····· 21
3. ODS Cloumn Choromatography에 의한 추출물 중 활성 분획 분리 ··· 24
4. HPLC에 의한 활성물질 분리 ····· 26

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5. GC/MSD 를 이용한 성분의 확인 ····· 28
Ⅳ. 결론 ····· 39
Ⅴ. 참고 문헌 ····· 41

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Tables

Table 1. List of algae for antioxigenic effect screening.

Table 2. Screening of antioxidants activities from Brown Algae.

Table 3. Screening of antioxidants activities from Green Algae.

Table 4. Screening of antioxidants activities from Red Algae.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of figures

Figure 1. Fraction of Marine Algae.

Figure 2. Extraction Scheme of Marine Algae.

Figure 3. GC/MSD Analysis procedure by MeOH fraction derivatization with TMS.

Figure 4. Antioxidants activities of Brown Algae.

Figure 5. Antioxidants activities of Green Algae.

Figure 6. Antioxidants activities of Red Algae.

Figure 7. Antioxidants activities of each species of Algae.

Figure 8. UV-Vis. spectra of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 9. UV-Vis. spectra of n-BuOH fraction of MeOH extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 10. UV-Vis. spectra of $CHCl_3$ fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 11. UV-Vis. spectra of MeOH fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 12. UV-Vis. spectra of H_2O fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 13. Separation of n-BuOH fraction of 98% MeOH extract from *Hizikia fusiforme* using HPLC.

Figure 14. Separation of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme.* using HPLC.

Figure 15. GC spectra of chloroform fraction of 50% MeOH Extract

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

from *Hizikia fusiforme.*

Figure 16. GC spectra of MeOH fraction of 50% MeOH Extract from *Hizikia fusiforme.*

Figure 17. MS spectra of 14.153 min peak of GC.

Figure 18. MS spectra of 16.597 min peak of GC.

Figure 19. MS spectra of 18.814 min peak of GC.

Figure 20. MS spectra of 20.419 min peak of GC.

Figure 21. MS spectra of 22.288 min peak of GC.

Figure 22. MS spectra of 26.421 min peak of GC.

Figure 23. MS spectra of 14.863 min peak of GC.

Figure 24. MS spectra of 20.047 min peak of GC.

Figure 25. MS spectra of 20.406 min peak of GC.

Figure 26. MS spectra of 20.502 min peak of GC.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

대기 중에 존재하는 산소에 의해 진행되는 산화반응은 생물체내에서 뿐만 아니라 식품 등에서도 광범위하게 발생되는 현상이다. 산화 반응은 식품의 경우 산패를 발생시키며, 인체에 있어서는 노화 및 각종 질병을 유발시킨다. 따라서 이 문제를 해결하기 위한 여러 가지 시도가 진행되고 있다. 그 중 대표적인 것으로 항산화제가 있다.[1] 항산화제는 그 기능상 유리 라디칼 저해제, 금속재거제, 과산화물 분해제와 상승제 등으로 나눌수 있으며, 또한 일반적으로 천연 항산화제와 합성 항산화제로 크게 나눌수 있다.

천연 항산화제로는 Tocopherol 과 비타민 C 등이 있으나 항산화 효과가 낮거나 비교적 고가이다. 그리고 합성 항산화제는 크게 페놀계, 아민계, 설파이드계 등으로 분류되나 항산화제의 필수요건[2]으로 비추어 볼 때, 아민류나 설파이드류의 화합물은 부적당하며 지금은 대부분 페놀계를 다방면에서 많이 사용하고 있다. 현재 많이 사용하고 있는 페놀성 항산화제로서는 천연 항산화제인 토코페롤과 합성 항산화제인 Propylgallate, BHA(butyl hydroxyanisole), BHT(butyl hydroxytoluene), TBHQ(t-butylhydroquinone) 등이 있다. 이들은 페놀계통의 화합물로서 OH기가 유지 등에 생성된 free radical의 수용체로 작용하여 자유라디칼 연쇄반응을 저해함으로서 산화 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다.[3] 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)과 BHT(bu-tylated hydroxytoluene)은 50mg/kg/day 이상을 섭취할 경우 생체 효소 및 지방의 변화로 병, 암을 유발시키는 등 거의 모든 합성 항산화제가 인체 독성을 가지고 있다고 보고 되어 있으며[4,5] 대부분이 사용 규제를 받고 있다. 그러나, 이들의 높은 항산화력과 저렴한 가격 등의 이유로 아직까지 많이 사용되고 있다. 이러한 이유로 최근에는 천연물로 부터 인체에 해가 없는 항산화제를 개발하고자하는 연구가 활발히 진행되어지고 있다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

식물 성분 중에 함유된 항산화성 생리 활성 성분에 관한 연구는 다음과 같다. Burton은 Carotenoid가 peroxyl radical과 반응함으로써 유지 산패를 억제한다고 보고하였다.[6] Igarashi 등은 색소물질로 알려진 anthocyanin이 항산화 작용에 관계한다고 보고하였으며,[7] Ramarathnam 등은 왕겨의 메탄올 추출물 중 Flavonoid 물질이 강한 항산화성을 낸다고 보고하였다.[8,9] 인삼에도 항산화효과가 있다는 보고가 있으며,[10-12] 일반적으로 유지를 많이 함유한 식물 종자에는 항산화 물질이 함유되어 있다고 보고 되어 있다.[13,14] Shin-ya 등은 미생물 균주인 Streptomyces SP CL190으로부터 naphterpin 이라는 항산화제를 추출하여 그 구조를 규명하였고[15] Teshima 등과 Mo 등도 미생물에서 항산화 물질을 추출하여 보고 하였으나[16,17] 실용화에는 실패 하였다. 대부분의 항산화 물질에 대한 연구는 육상 식물에서 이루져 있고 연구 대상이 한계치에 다다르고 있다.

해양은 지구 면적의 71%를 차지하며 50만종 이상의 다양한 생물이 서식하고 있으며 해양 생물은 육상 생물과 다른 환경으로 인하여 생체내 2차 대사산물의 화학구조가 매우 독특하여 해양 천연물의 2차 대사산물은 생리 기능이나 생태계의 제어에 중요한 생리 활성 물질을 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다.[18,19] 해양 생물에 대하여는 일본 등지에서 많은 연구가 진행되었다. 해조류에서 천연 항산화 물질을 분리 연구한 보고를 살펴보면 Takaki 와 Miyashita가 일본 근해에서 서식하는 12종의 해조류로부터 천연물을 추출하여 이 물질에 대한 tocopherol 성분을 조사한 바 있다.[20] Kanenika 등은 역시 일본 근해에서 서식하는 해조류로부터 항산화성 물질을 추출하여서 해조류의 지질 성분 중에서 항산화성을 갖는 5-olefinic acid등이 존재한다고 보고하였고,[21] Nishibori 와 namiki 등은 7종류의 해조류를 헥산/에탄올로 항산화물질을 추출하여 그들의 항산화활성을 측정하여 김과 미역에서 추출된 지질이 기존에 사용되어 오던 BHA ,α -tocopherol에 필적할 만한 항산화성을 나타낸다고 보고 하였다.[22] Kaneda 와 Ando는 일본 해안에 생육하는 21종의 해조류 중 김 등 에

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

서 항산화력을 가진 phospholipids 를 분리 보고 하였고,[23] Fujimoto 와 Kaneda는 36종의 해조류 중 홍조류인 빨간 검둥이과의 *Rhodomela*속 과 *Polysiphonnia*속에서 5-bromo-3,4-hydroxybenzenaldehyde라는 활성이 뛰어난 새로운 천연 항산화 물질을 분리 보고 하였다.[24]

우리 나라에서는 박 등이 동해안 연안에서 생육하는 톳, 다시마, 미역, 구멍쇠미역 등 12종의 해조류로부터 메탄올과 클로로포름을 사용하여 추출물을 얻어 항산화 활성을 측정하여서 김, 미역, 다시마 등에서 BHA 보다 우수한 항산화 물질을 얻었다고 보고하였다.[25] 조 등은 우리 나라의 수산 미이용 자원인 별 불가사리, 우렁쉥이 껍질, 오징어 먹즙, 성게 껍질 등 비식용 수산 폐기물과 괭생이 모자반, 구멍쇠 미역, 참빗물, 산말 등의 식용 및 비식용 해조류에서 항산화 물질의 추출을 하였다.[26]

해조류는 오래 전부터 우리 나라를 비롯한 극동지역에서 식용되고 있고, 비타민, 무기질 등이 균형 있게 분포되어 있어서 대사작용을 개선함은 물론, 저칼로리 다당류는 식이성 섬유로서 전장 작용과 유독 물질 제거 효과가 있고 특정의 다당류 및 저분자 생리 활성 물질은 혈압과 콜레스테롤치의 정상화, 암 예방 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 해조 등의 다당류 및 생약제 등에도 항균, 항암물질이 분포하여 식물의 이용에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다.[27,28]

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

갈조류인 톳은 형태상 원주상의 줄기로 체장 20～100cm까지 성장하는 다년생 해조류이다. 수심 0～2m의 조간대의 암초지대에 부착, 서식하며 우리나라 중부 이남 각 연안, 서남해안 , 일본 , 동중국해등 폭넓게 분포하고 있다. 특히, 우리 나라는 제주도, 완도, 진도를 중심으로 한 서남 해안 일대가 주산지이다. 톳은 노인성치매, 당뇨병, 대장암, 고혈압 예방, 노화방지, 변비 등에 효과가 좋으며 요오드 성분 함유량이 많아 갑상성 암 및 각기 병 예방에 효과가 있다고 알려져 있으며[27] 일본의 Kobe steel에서 특허 출원한 자료로부터는 톳(*hizikia fusiforme*)이 가장 항산화 능력이 좋았으며 추출량도 많은 것으로 되

어 있다.

이에 본 연구에서는 제주도 연안에서 해조류를 채집하여 항산화 활성을 검색하려 하였다. 또한 일상 생활에서 흔히 접할 수 있고 제주도가 주생산지인 톳으로부터 항산화 활성 분획 및 항산화 물질(유효성분)을 분리 · 동정하려고 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 해조류의 항산화 활성 검색

1) 재료

46종의 해조류(녹조 6종, 갈조 18종, 홍조 22종)는 귀덕, 외도, 서귀포, 성산에서 채취하였다. 시료 채집은 해조가 서식하고 있는 수심에 따라 간조대에 해변가에서 직접 채취하거나, 잠수 혹은 SCUBER를 이용하여 이루어졌다. 채집된 시료의 동정은 해조분류학자인 제주대 생물학과 이용필 교수님에 의하여 행하여졌다. 채취한 시료를 수돗물로 2 - 3번 씻어서 염분을 제거하고, 바람이 잘 통하는 그늘진 곳에서 완전히 건조 시키고 시료를 파쇄기로 미세하게 파쇄시켜 냉동실(-20℃)에서 보관하면서 실험에 사용하였으며 실험에 사용한 해조류는 Table 1 과 같다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. List of algae for antioxigenic effect screening.

SS:성산 , SG:서귀포, CH:제주, GD:귀덕

Code 번호	한국명	학명
960203-SS-01	감태	*Ecklonia cava*
960822-SG-17	감태	*Ecklonia cava*
960203-SS-05	부챗말	*Padium contractum*
960822-SG-13	부챗말	*Padium contractum*
960203-SS-09	지충이	*Sargassum thunbergii*
960203-SS-11	톳	*Hizikia fusiformis*
960204-GD-01	톳	*Hizikia fusiformis*

- Continue -

Code 번호	한국명	학명
960302-GD-12	붉은부챗살	*
960302-GD-21	미역	*Undaria pinnatifida*
960503-CH-05	바위두룩	*Leathesia difformis*
960503-CH-13	패	*Ishige okamurae*
960503-CH-15	바위수염	*Myelophycus simplex*
960822-SG-04	열매의관말	*Carpomitra cabrerae*
960822-SG-12	가시뼈대 그물말	*Dictyopteris prolifera*
960203-SS-03	꽈배기모자반	*Sargassum siliquastrum*
960302-GD-04	꽈배기모자반	*Sargassum siliquastrum*
960203-SS-08	짝잎모자반	*Sargassum hemiphyllum*
960302-GD-18	큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*
960203-SS-10	큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*
960302-GD-05	괭생이모자반	*Sargassum horneri*
960302-GD-09	모자반	*Sargassum fulvellum*
960302-GD-14	쌍발이모자반	*Sargassum patens*
960822-SG-21	톱니모자반	*Sargassum serrutifolium*
970305-GD-06	톱니모자반	*Sargassum serrutifolium*
960203-SS-04	몽우리청각	*Codium contractum*
960302-GD-06	구멍갈파래	*Ulva pertusa*
960302-GD-17	창자파래	*Entermorpha intestinalis*
960822-SG-19	옥덩굴	*Caulerpa okamurae*
960822-SG-14	갈색대마디말	*Cladophora wrightiana*
960302-GD-20	*	*Cladophora densa*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

- Continue -

Code 번호	한국명	학명
960203-SS-02	개우무	*Pterocladia capillacea*
960203-SS-07	우뭇가사리	*Gelidium amansii*
960503-CH-10	개서실	*Chondaria crassicaulis*
960503-CH-11	까막살	*Carpopeltis affinis*
960204-GD-03	꼬시래기	*Gracilaria arcuata*
960204-GD-07	깃꼴서실	*Laurencia pinnata*
960204-GD-08	마디잘록이	*Lomentaria catenata*
960204-GD-11	불등풀가사리	*Gliopeltis furcata*
960204-GD-16	진두발	*Chondrus crispus*
960204-GD-19	털비단풀	*Ceraminum tenerrimum*
960204-GD-21	큰서실	*Laurencia nipponica*
960503-CH-04	갈래잎	*Schizymenia dubyi*
960503-CH-12	쌍발이서실	*Laurencia okamurae*
960503-CH-02	명주도박(+)	*Phyllymenia sparsa*
960503-CH-03	명주도박(-)	*Phyllymenia sparsa*
960503-CH-14	주름진두발	*Chondrus crispus*
960822-SG-15	나도펭꼬리	*Delisea fimbriata*
960822-SG-03	넓은게발	*Amphiroa dilatata*
960822-SG-09	자루바다표고	*Peyssonnelia caulifera*
960302-GD-22	작은구슬산호말	*Corallina officinalis*
960302-GD-13	비단풀	*Ceramium kondoi*
960503-CH-07	부채게발	*Amphiroa brevianceps*
960822-SG-05	팔손이붉은잎	*Callophyllis palmata*
960822-SG-18	미끌풀과	*Dumontia SP.*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2) 해조류로 부터 항산화 물질의 추출 및 항산화 활성 측정

준비된 시료 20g을 취하여 삼각플라스크에 넣고 200ml의 메탄올을 가하여 4시간 동안 교반 추출하고 여과시킨다. 그 잔사에 다시 200ml의 메탄올을 가하여 교반 추출하고 여과하여 용매 추출액을 얻는다. 용매 추출액을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻는다. 추출물의 항산화 활성은 Blois' method [29]를 사용하여 측정하였으며 그 방법을 서술하면 다음과 같다. 1,1-Di-phenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich) 약 20mg을 에탄올 150m에 녹여 DPPH 용액으로 제조하였다. 그리고 이 용액 600㎕에 DMSO 250ml를 첨가시키고 적당량의 에탄올로 희석한 후 10초간 진탕시켰다. 그리고 517nm 의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 흡광도가 0.98 ~ 1.00 이 되도록 조정하였다. 역시 동일한 방법으로 흡광도가 0.98 ~ 1.00 인 DPPH 용액 3ml에 항산화 물질 시료 1mg/ml용액을 100㎕씩 각각 넣고 충분히 섞은 후 10분간 흡광도 감소치를 DPPH radical 소거활성으로 하여 항산화 활성도를 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 톳으로 부터 항산화 물질의 분리 및 동정

1) 항산화 성분의 추출 및 분획

추출은 다음과 같이 두가지 방법으로 수행하였다.

(1) 추출 방법 1

추출은 Figure 1 과 같이 수행하였다. 시료(톳) 100g을 취하여 삼각플라스크에 넣고 800ml의 메탄올을 가하여 24시간동안 교반 추출하고 여과한다.

이와 같은 방법으로 잔사에 대하여 반복 실시하여 용매 추출액을 얻는다. 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻는다. 이 추출물에 Hexane 과 80% MeOH를 추출물의 50배의 양을 가하여 Hexane 분획과 80% MeOH층을 얻는다. 80% MeOH층을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻고, 이 추출물에 Chloroform 과 30% MeOH를 추출물의 50배의 양으로 가하여 Chloroform 분획과 30% MeOH층을 얻는다. 다시 30% MeOH층을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻고, 이 추출물에 *n*-BuOH과 증류수을 같은량 가하여 *n*-BuOH 분획과 H_2O 분획을 얻는다.

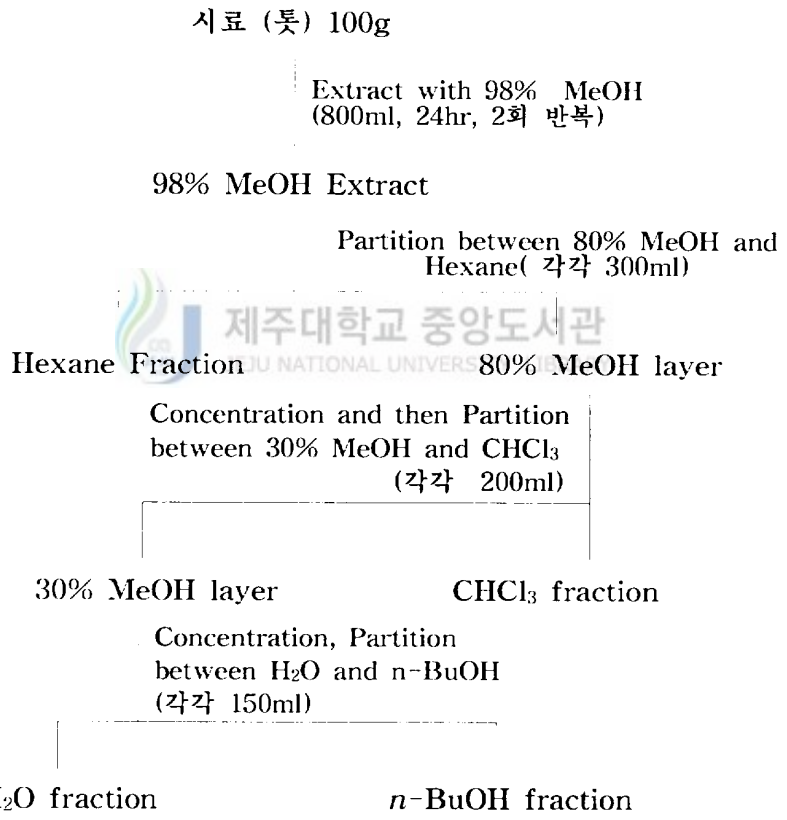


Figure 1. Fraction of Marine Algae

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(2) 추출 방법 2

추출 방법은 Figure 2 와 같이 수행하였다. 시료 100g을 취하여 삼각 플라스크에 넣고 800ml의 chloroform 을 가하여 24시간동안 교반 추출하고 여과하여 chloroform 추출액을 얻는다. 그 잔사에 MeOH, 50% MeOH 순서로 반복 추출하여 MeOH 추출액과 50% MeOH 추출액을 얻는다.

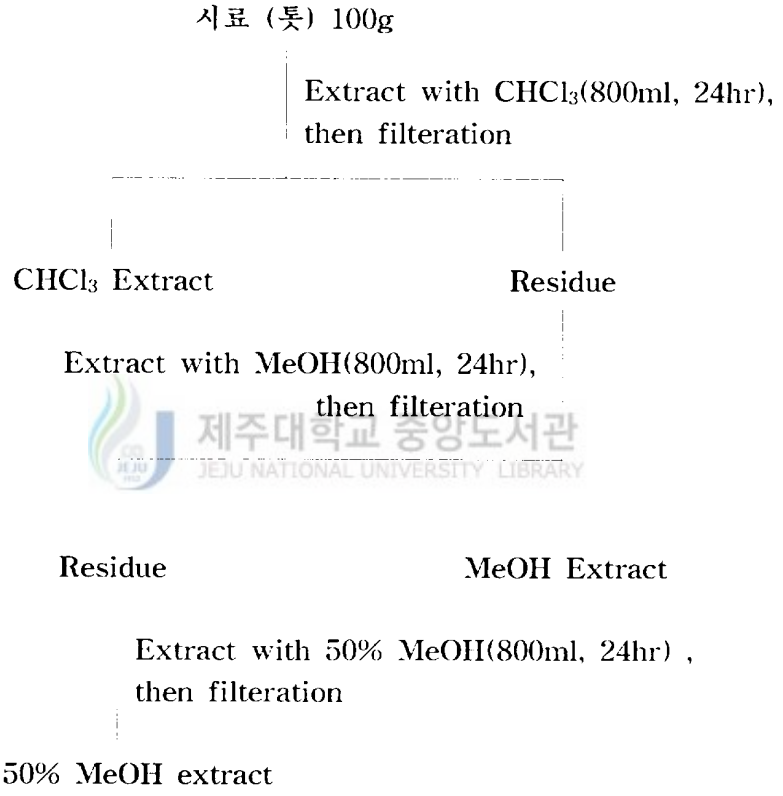


Fig 2. Extraction Scheme of Marine Algae

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 각 분획과 각 추출물의 항산화 활성 측정

Figure 1 의 과정을 통하여 얻은 각 분획과 Figure 2 의 과정을 통하여 얻은 각 추출물에 대하여 UV-Visible Spectrophotometer를 이용한 Blois' Method 로서 각 분획 및 추출물의 항산화 활성을 측정하였다.

4. ODS Column Chromatography에 의한 추출물 중 활성 분획 분리

추출물 중 가장 활성이 뛰어난 것으로 나타난 50% MeOH 추출물에 대하여 ODS Column Chromatography를 행하였다. 50% MeOH 추출물을 H_2O로 elution 시켜 추출물 중 염을 제거 한 후 MeOH 분획을 얻는다. 이 분획으로부터 H_2O 분획, Chroloform 분획, MeOH 분획을 얻었다. 그 방법은 다음과 같이 수행한다. 50% MeOH 추출물중 활성 분획 분리를 위하여 glass column(2.5×60)에 ODS을 충진한다. 시료를 일정량 흡착 시킨 후 H_2O로 elution 시켜 추출물 중 염을 제거 한 후 MeOH을 elution 시켜 MeOH 분획을 얻는다. 이 분획을 감압 농축시킨 후 다시 이 분획에 대하여 H_2O, Chroloform , MeOH 로 순차적으로 분출시켜서 H_2O 분획, Chroloform 분획, MeOH 분획을 얻었다. 즉 H_2O, Chroloform, MeOH 순으로 각 300ml씩 가하여 단계적으로 용출하여 H_2O 분획, Chroloform 분획, MeOH 분획을 얻고 감압 농축한다. 그리고 이들 분획에 대하여 항산화 활성을 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관

5. GC/MSD를 이용한 항산화 성분의 확인

분리한 각 분획 중 Chloroform 분획과 MeOH 분획을 GC/MSD로 분석하였으며 MeOH 분획은 Figure 3 의 방법으로 TMS 유도체로 변환한 후 분석하였다. GC/MSD는 HP5890/HP7892A 모델을 사용하였으며 Column은 HP-5(30m×0.25㎜×0.25㎛)를 사용하였으며 조건은 다음과 같다.: Carrier Gas He, Initial temp 50℃, Initial time 3min, Rate 10℃/min, Final temp 250℃, Final time 5min, Inj. temp 250℃, Det. temp 280℃, Database Wiley138.

MeOH 분획

BSTFA* /CH_3CN (24hr, RT)

semi-silicagel column chromatography

extact with CH_3CN

GC/MSD

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 3. GC/MSD analysis procedure by MeOH fraction derivatization with TMS. [*bis(trimethylsily)trifluoroacetamide]

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 해조류의 항산화 활성 검색

46종의 해조류에 대한 항산화 활성을 측정하여 검색한 결과는 다음과 같다. 갈조류의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 2 과 Figure 4 에 보여졌다.

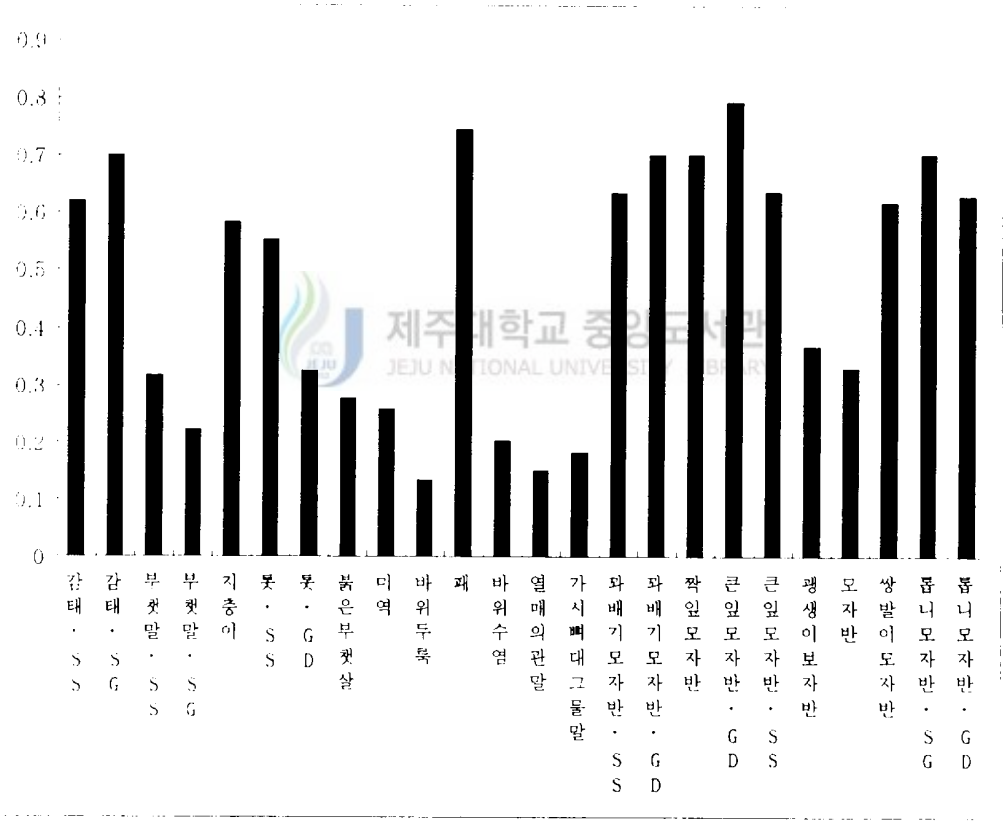


Figure 4. Antioxidants activities of Brown Algae.

Table 2. Screeninng of antioxiants activities from Brown Algae.

SS:성산 , SG:서귀포, CH:제주, GD:귀덕
△A : Decrease of adsorbance at 517nm

Code 번호	한국명	학명	△A
960203-SS-01	감태	*Ecklonia cava*	0.6205
960822-SG-17	감태	*Ecklonia cava*	0.7009
960203-SS-05	부챗말	*Padium contractum*	0.3175
960822-SG-13	부챗말	*Padium contractum*	0.2212
960203-SS-09	지충이	*Sargassum thunbergii*	0.5822
960203-SS-11	톳	*Hizikia fusiformis*	0.5541
960204-GD-01	톳	*Hizikia fusiformis*	0.3243
960302-GD-12	붉은부챗살	*	0.2750
960302-GD-21	미역	*Undaria pinnatifida*	0.2566
960503-CH-05	바위두룩	*Leathesia difformis*	0.1337
960503-CH-13	패	*Ishige okamurae*	0.7454
960503-CH-15	바위수염	*Myelophycus simplex*	0.2022
960822-SG-04	열매의관말	*Carpomitra cabrerae*	0.1516
960822-SG-12	가시뼈대 그물말	*Dictyopteris prolifera*	0.1820
960203-SS-03	꽈배기모자반	*Sargassum siliquastrum*	0.6362
960302-GD-04	꽈배기모자반	*Sargassum siliquastrum*	0.7023
960203-SS-08	짝잎모자반	*Sargassum hemiphyllum*	0.7032
960302-GD-18	큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0.7950
960203-SS-10	큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0.6379
960302-GD-05	괭생이모자반	*Sargassum horneri*	0.3678
960302-GD-09	모자반	*Sargassum fulvellum*	0.3297
960302-GD-14	쌍발이모자반	*Sargassum patens*	0.6207
960822-SG-21	톱니모자반	*Sargassum serrutifolium*	0.7052
970305-GD-06	톱니모자반	*Sargassum serrutifolium*	0.6325

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

검색 결과를 살펴보면 갈조류는 큰잎모자반(GD), 패(CH), 톱니보자반(SG), 짝잎모자반(SS), 꽈배기모자반(GD), 감태(SG), 큰잎모자반(SS), 꽈배기모자반(SS), 톱니모자반, 감태(SS), 지충이(SS), 톳(SS)의 순으로 항산화활성정도가 감소하고 있다. 갈조류의 절반 가량이 상당한 항산화 활성을 가지고 있으며 특히, 모자반류의 항산화 활성이 큰 것으로 나타났다.

녹조류의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 3 와 Figure 5 에 보여졌다. 검색 결과를 살펴보면 녹조류는 구멍갈파래, 갈색대마디말, 창자파래, 몽우리청각, 옥덩굴순으로 항산화 활성이 감소하였고 그다지 큰 활성을 가지는 것은 없는 것으로 나타났다

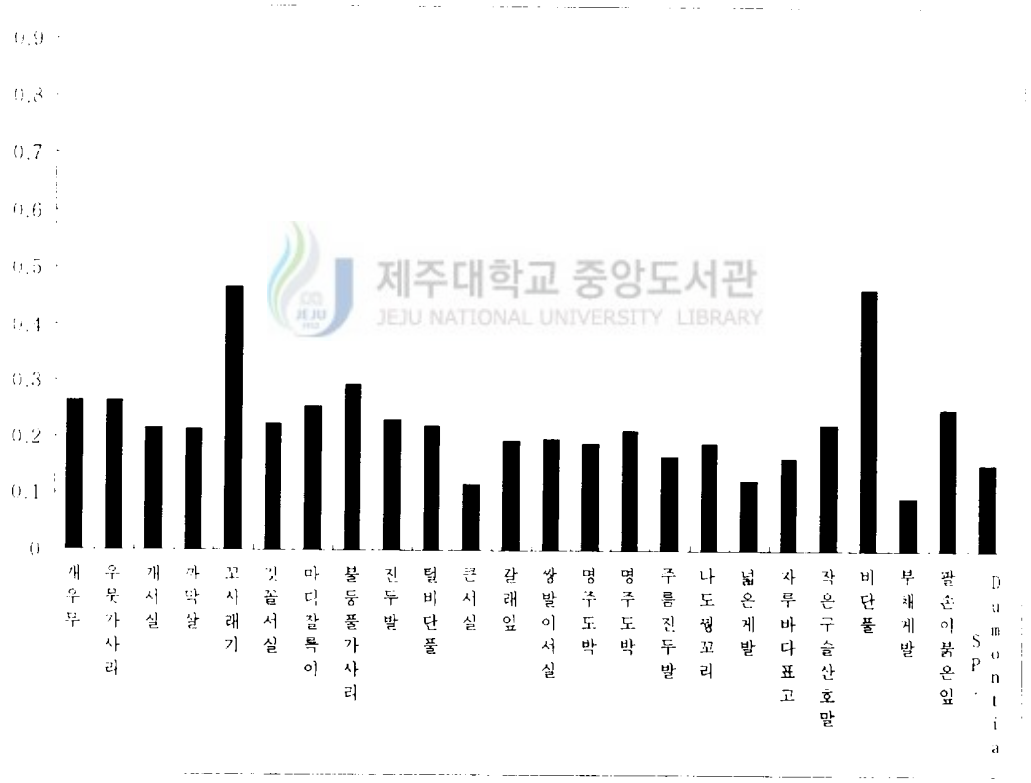


Figure 5. Antioxidants activities of Green Algae.

Table 3. Screeninng of antioxiants activities from Green Algae

SS:성산 , SG:서귀포, CH:제주, GD:귀덕
△A : Decrease of adsorbance at 517nm

Code 번호	한국명	학명	△A
960203-SS-04	몽우리청각	*Codium contractum*	0.2103
960302-GD-06	구멍갈파래	*Ulva pertusa*	0.3065
960302-GD-17	창자파래	*Entermorpha intestinalis*	0.1447
960822-SG-19	옥덩굴	*Caulerpa okamurae*	0.2277
960822-SG-14	갈색대마디말	*Cladophora wrightiana*	0.2557
960302-GD-20	*	*Cladophora densa*	0.0406

홍조류의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 4 와 Figure 6 에 보여졌다. 검색 결과를 살펴보면 홍조류는 비단풀과 꼬시래기를 제외한 대부분이 활성을 거의 가지지 않는 편이었으며 비단풀과 꼬시래기는 0.46 정도의 흡광도 감소치를 보였으나 갈조류에 비하면 항산화 정도가 낮았다. 이와 같은 결과는 앞선 연구 발표 내용과 일치하는 것으로 나타났다. 해조류의 종류에 따른 항산화 활성은 Figure 7 에 보여졌으며 갈조류가 다른 해조류에 비하여 월등한 효과가 있음을 알 수 있다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

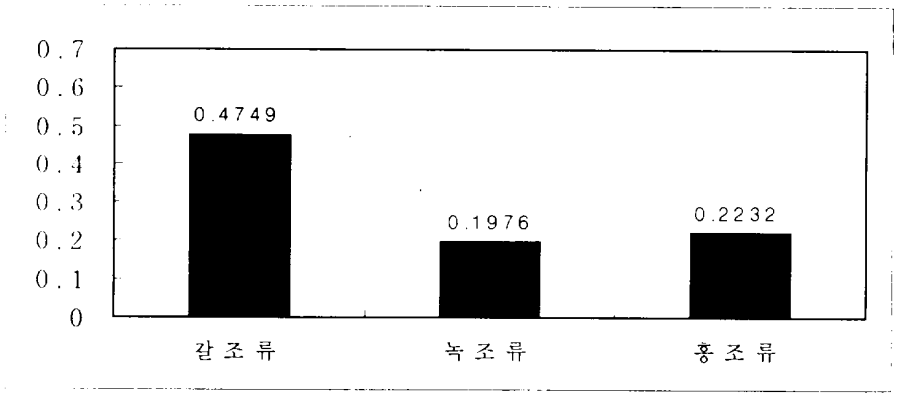


Figure 7. Antioxidant activities of each species of Algae

이와 같은 결과로부터 갈조류 특히, 모자반 속의 해조류로부터 항산화 물질을 개발할 만한 가치가 있다고 생각된다.

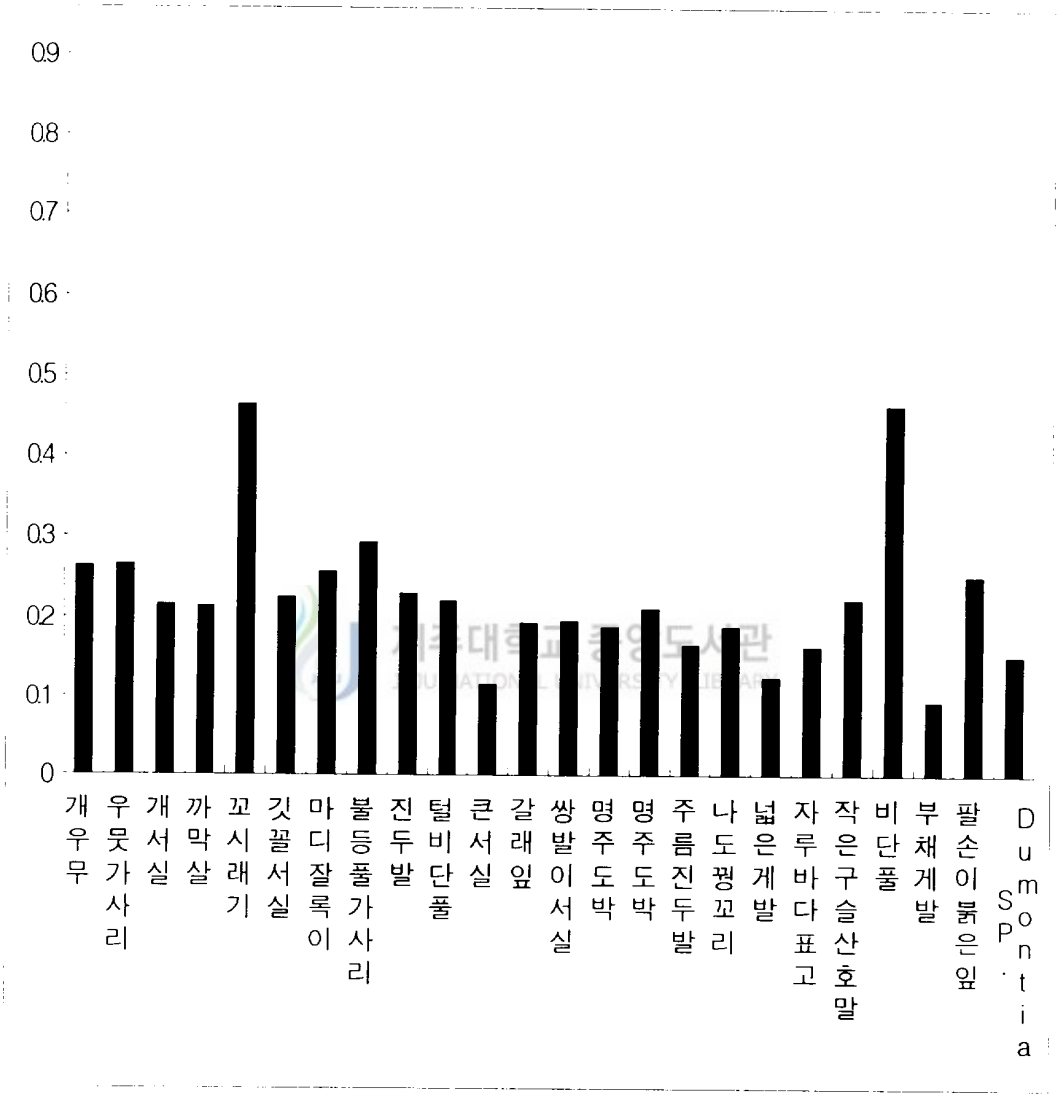


Figure 6. Antioxidants activities of Red Algae.

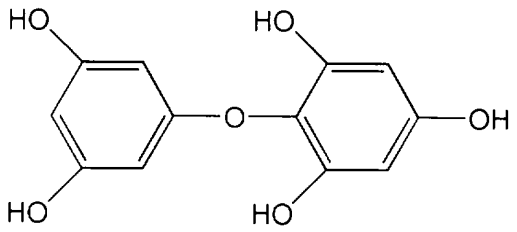
Table 4. Screeninng of antioxiants activities from Red Algae.

SS:성산 , SG:서귀포, CH:제주, GD:귀덕
△A : Decrease of adsorbance at 517nm

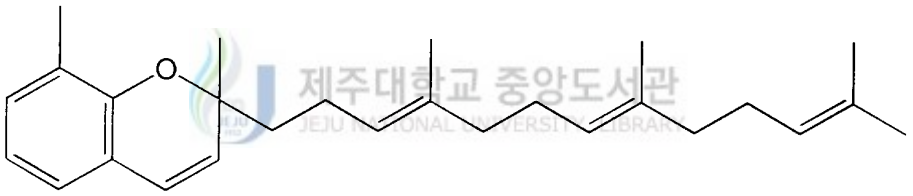
Code 번호	한국명	학명	△A
960203-SS-02	개우무	*Pterocladia capillacea*	0.2630
960203-SS-07	우뭇가사리	*Gelidium amansii*	0.2636
960503-CH-10	개서실	*Chondaria crassicaulis*	0.2152
960503-CH-11	까막살	*Carpopeltis affinis*	0.2122
960204-GD-03	꼬시래기	*Gracilaria arcuata*	0.4642
960204-GD-07	깃꼴서실	*Laurencia pinnata*	0.2228
960204-GD-08	마디잘록이	*Lomentaria catenata*	0.2544
960204-GD-11	불등풀가사리	*Gliopeltis furcata*	0.2927
960204-GD-16	진두발	*Chondrus crispus*	0.2293
960204-GD-19	털비단풀	*Ceraminum tenerrimum*	0.2193
960204-GD-21	큰서실	*Laurencia nipponica*	0.1156
960503-CH-04	갈래잎	*Schizymenia dubyi*	0.1917
960503-CH-12	쌍발이서실	*Laurencia okamurae*	0.1956
960503-CH-02	명주도박(+)	*Phyllymenia sparsa*	0.1884
960503-CH-03	명주도박(-)	*Phyllymenia sparsa*	0.2104
960503-CH-14	주름진두발	*Chondrus crispus*	0.1655
960822-SG-15	나도풍꼬리	*Delisea fimbriata*	0.1887
960822-SG-03	넓은게발	*Amphiroa dilatata*	0.1241
960822-SG-09	자루바다표고	*Peyssonnelia caulifera*	0.1621
960302-GD-22	작은구슬산호말	*Corallina officinalis*	0.2220
960302-GD-13	비단풀	*Ceramium kondoi*	0.4626
960503-CH-07	부채게발	*Amphiroa brevianceps*	0.0930
960822-SG-05	팔손이붉은잎	*Callophyllis palmata*	0.2503
960822-SG-18	*	*Dumontia SP.*	0.1508

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

해조류에 대한 연구에서 항산화성을 가지고 있는 물질을 분리하고 구조를 규명한 자료를 살펴보면, 갈조류인 모자반류에서부터 $CHCl_3/MeOH/H_2O$인 용매계로 추출하여 다음과 같은 Tannin계 항산화물질이 분리되어 있다.[31]

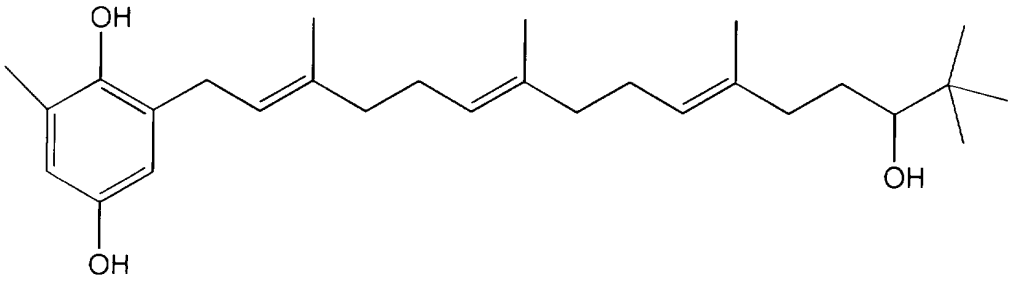


Numata, A. 등 은 모자반류인 Sagassumn Tortile에서 Toperol 과 유사한 지용성 Phenol성분을 분리하였는데 그 대표적인 구조는 다음과 같았다.[32]

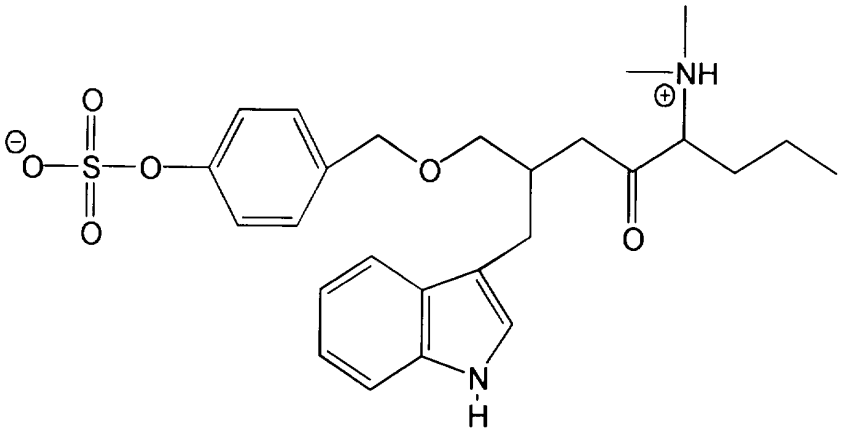


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

花王(Kao) 주식회사에서는 모자반에서 다음과 같은 Phenol 성 화합물을 분리 보고하였다.[33]

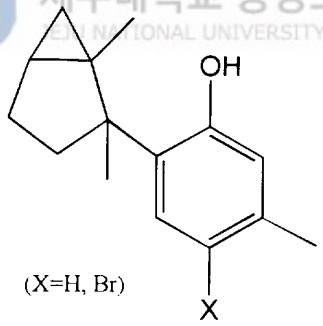


그리고 홍조류로부터는 보라잎과의 해조류로부터 다음과 같은 항산화성 Indole 화합물을 분리한 보고[34]와



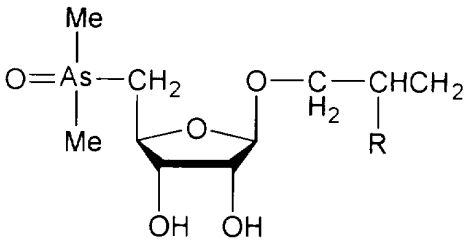
서실(Laurencia)로부터 다음과 같은 Phenol성 항산화 물질을 분리한 보고가 있다.[35]

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



이러한 모든 연구 자료는 일본에서 이루어졌으며 항산화 활성이 큰것으로 나타난 갈조류의 모자반류와 홍조류의 서실류에서부터의 항산화 물질을 분리하고 구조 결정이 이루어 졌다. 그러나 톳은 상당한 정도의 항산화 활성이 있으나 아직까지 그 유효성분에 대한 보고가 이루어진 적은 없다. 참고로 Edmo

-nds, J. S. 등은 톳으로 부터 비소함유 Ribofuranoside를 분리[36] 그 구조를 다음과 같이 보고하였다. 특히 우리나라에서는 모든 해조류로부터의 활성에 대한 보고는 많으나 아직까지 항산화 물질을 분리하고 그 구조를 결정한 것은 아직까지 없었다. 따라서, 본 실험에서는 항산화 활성이 모자반에 비하여 다소 떨어지나 연구가 거의 이루어지지 않았고 제주도가 주산지인 톳으로 부터 항산화 물질을 분리 동정하고자 시도하였다.



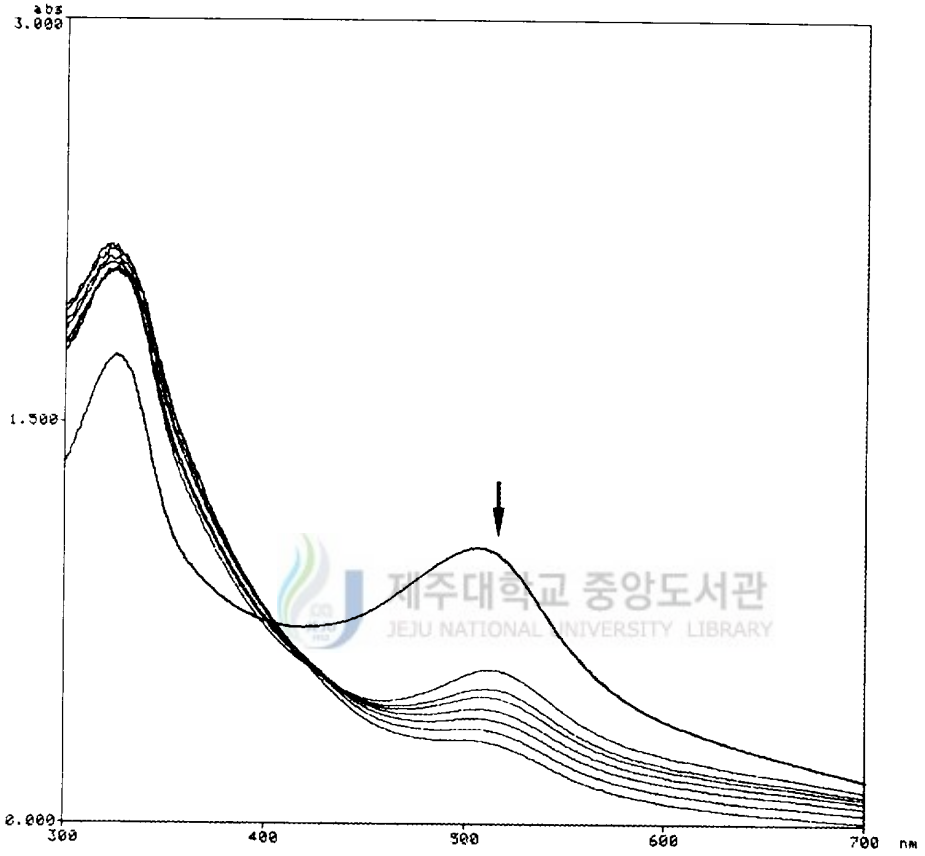
2. 각 추출물과 각 분획에 대한 항산화 활성

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 2 의 과정에 의하여 얻은 각 추출물들에 대한 항산화 활성을 조사한 결과는 다음과 같다.

	추출량 (g)	항산화 활성 정도 ($\triangle A_{517nm}$)
Chloroform 추출물	0.60	0.12
MeOH 추출물	2.48	0.45
50% MeOH 추출물	3.08	0.82

위의 결과에서 MeOH 추출물과 50% MeOH 추출물은 상당한 항산화 활성이 있는 것으로 나타났다. 특히, 50% MeOH 추출물은 굉장한 항산화 활성을 나타내었는데 이 추출물의 UV-Vis. Data는 Figure 8 과 같다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 8. UV-Vis. spectra of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

Figure 1 의 과정에 의하여 얻은 각 Fraction 들에 대한 항산화 활성을 조사한 결과는 다음과 같다.

	추출량(g)	항산화 활성 정도 ($\triangle A_{517nm}$)
Hexane 분획	1.08	0.21
80% MeOH 분획	3.16	0.45
Chloroform 분획	0.64	0.33
30% MeOH 분획	2.18	0.40
H_2O 분획	1.32	0.11
n-BuOH 분획	0.68	0.52

위의 결과에서 *n*-BuOH분획에서 활성이 있는 것으로 나타났으며 UV-Vis. Data는 Figure 9 에 나타내었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

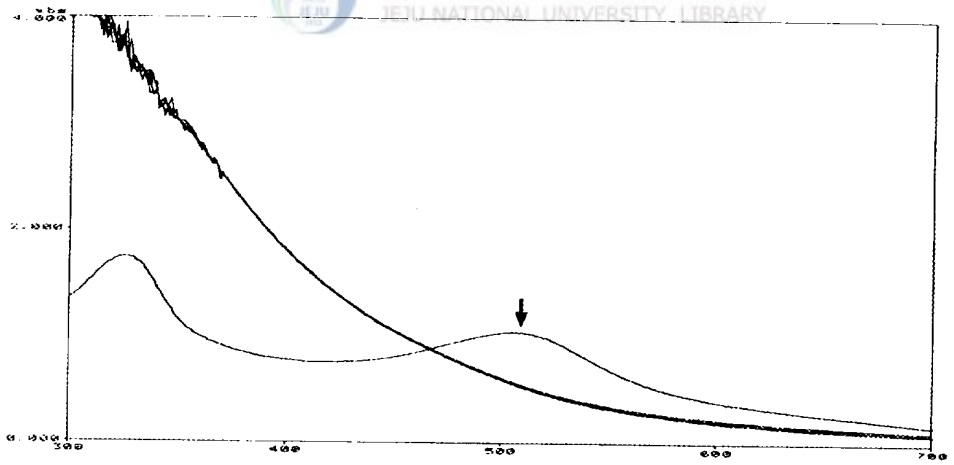
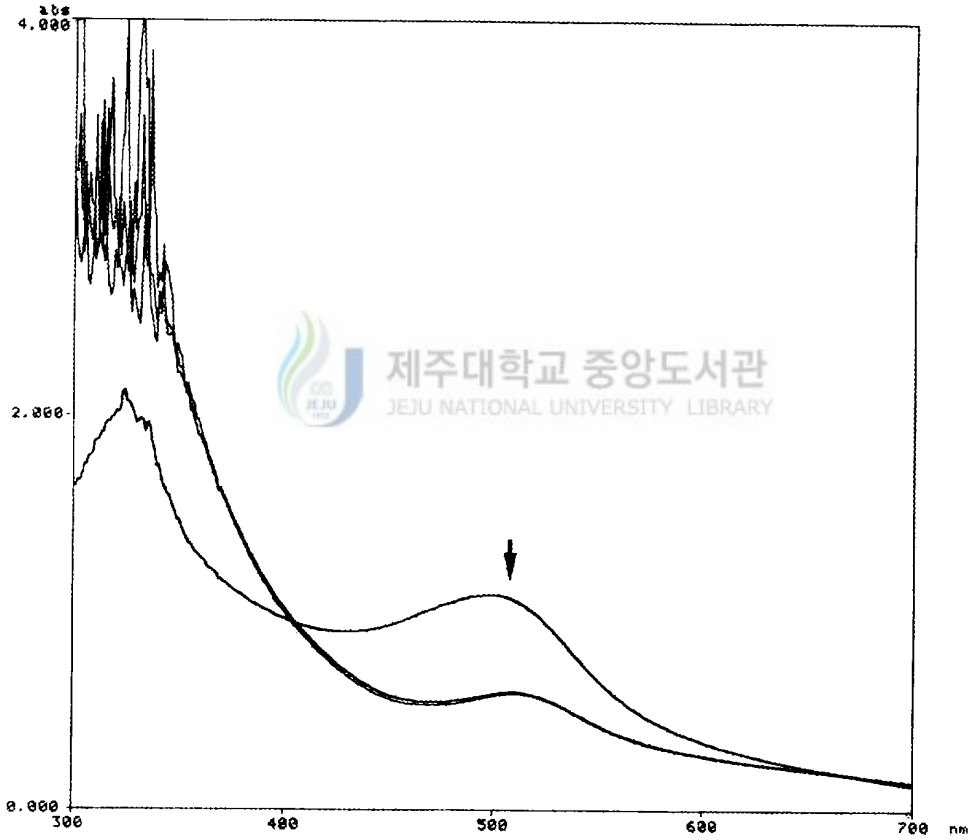


Fig. 9. UV-Vis. spectra of n-BuOH fraction of MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

3. ODS Column Chromatography에 의한 추출물 중 활성 분획 분리

50% MeOH 추출물의 각 분획별 활성을 측정한 결과 Chloroform은 0.45, MeOH 는 0.81, H_2O는 0.67로 나타났다. 그 결과는 다음의 Figure 10, Figure 11, 그리고 Figure 12 에 보여졌다. 이것으로부터 항산화 활성이 뛰어난 50% MeOH 추출물의 항산화 활성은 MeOH 분획에 주로 기인함을 알 수 있다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 10. UV-Vis. spectra of $CHCl_3$ fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

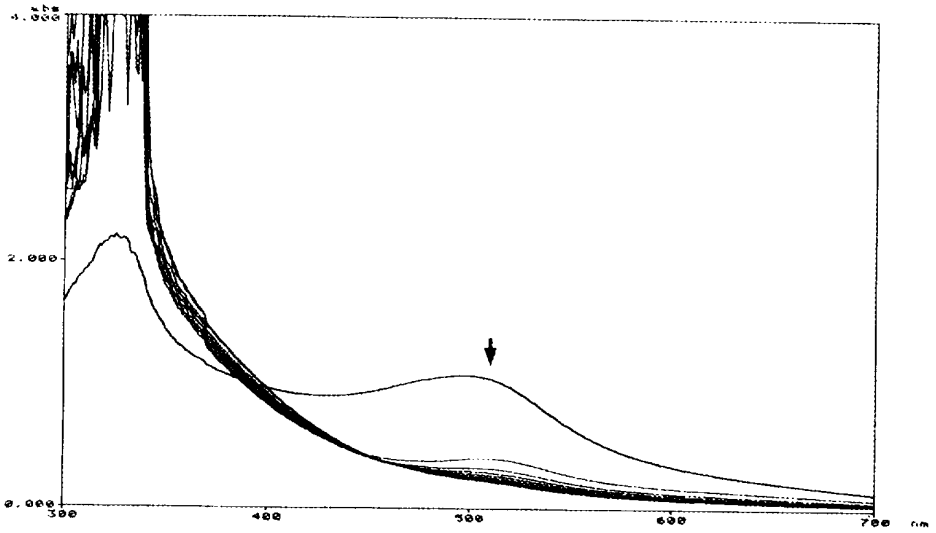


Fig. 11. UV-Vis. spectra of MeOH fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

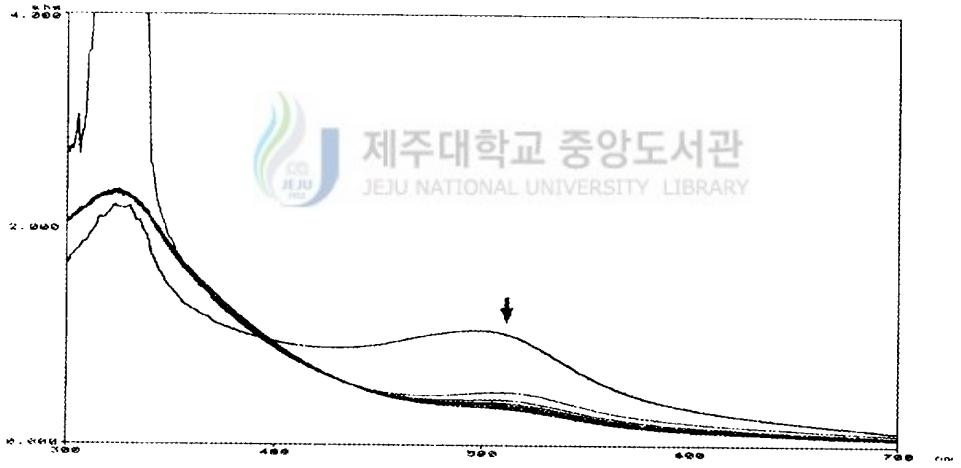


Fig. 12. UV-Vis. spectra of H_2O fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

MeOH 분획과 더불어 Chloroform 분획과 H_2O 분획이 50% MeOH 추출물의 활성에 상승 작용(synergic effect)를 일으킨 것으로 생각할 수 있다.

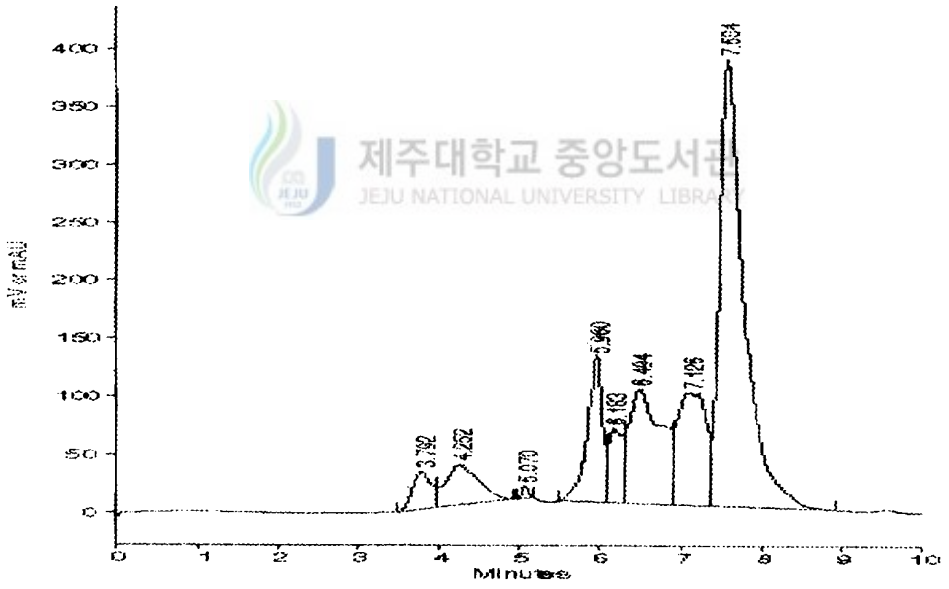
4. HPLC 에 의한 활성 물질 분리

항산화 활성이 뛰어난 것으로 나타난 *n*-BuOH 분획과 50% MeOH 추출물에 대하여 HPLC 로 분리하여 보았다. *n*-BuOH분획은 8개의 피크로 나뉘어졌으며 그 조건은 다음과 같다. (Figure 13)

Column : μ -Bondapark 18

Mobile phase : $H_2O/CH_3CN(30/70)$

Flow rate : 1.5 ml/min



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

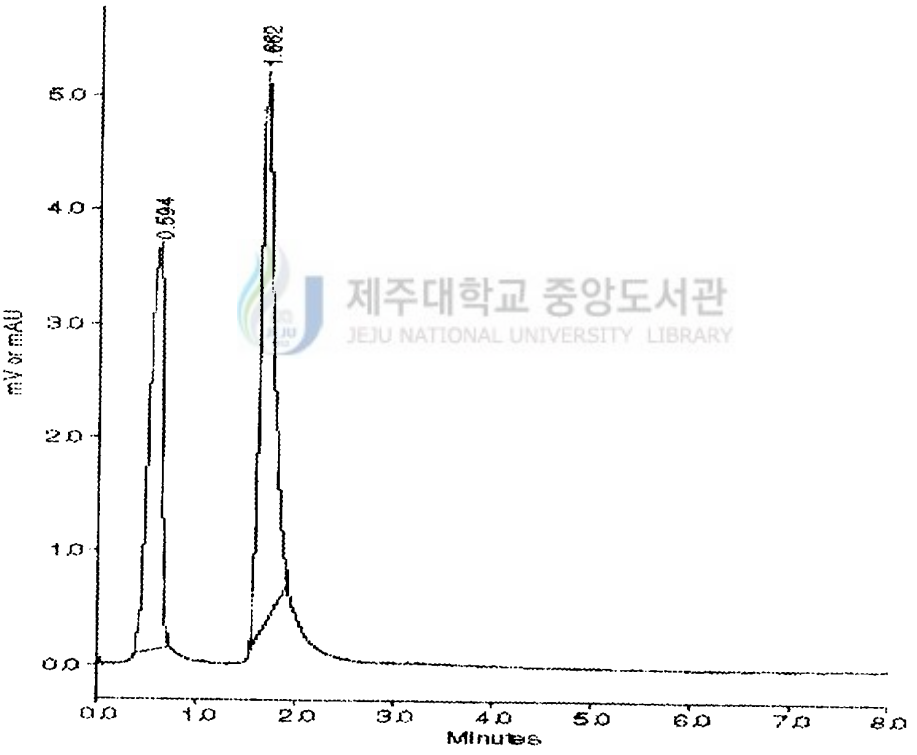
Figure 13. Separation of n-BuOH fraction of 98% MeOH extract from *Hizikia fusiforme* using HPLC.(UV Detector:254nm)

50% MeOH 추출물은 2개의 피크로 나뉘어졌으며 그 조건은 다음과 같다. (Figure 14)

Column : μ -Bondapark 18

Mobile phase : MeOH/CH_3CN(95/5)

Flow rate : 2 ml/min



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 14. Separation of 50% MeOH extract from *Hizikia fusifor -me.* using HPLC.(UV Dector:254nm)

5. GC/MSD를 이용한 성분의 확인

톳의 50% MeOH 추출물의 Chloroform 분획과 TMS 유도체로 변환한 MeOH 분획에 대하여 GC/MSD를 이용하여 성분을 분리하고 각 피크에 대하여 Mass library spectrum과 비교하여 분획 중 성분을 확인하였다. 각 분획의 GC data은 figure 15 과 figure 16 에 나타내었다.

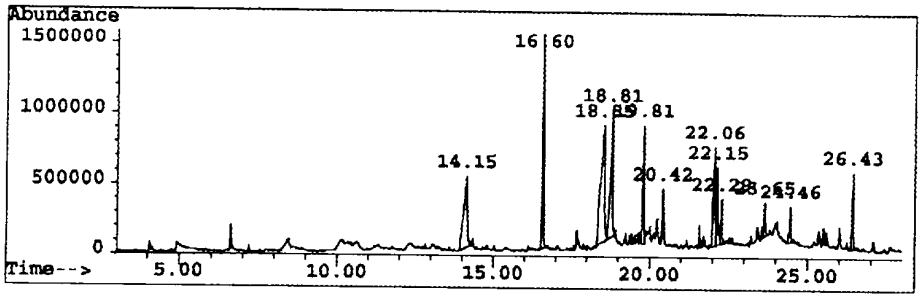


Fig. 15. GC spectra of chloroform fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

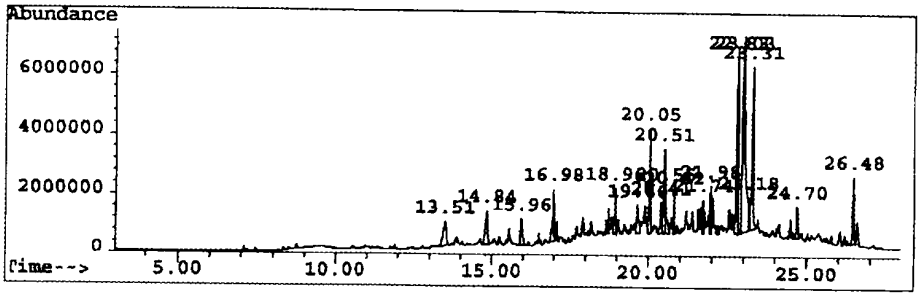
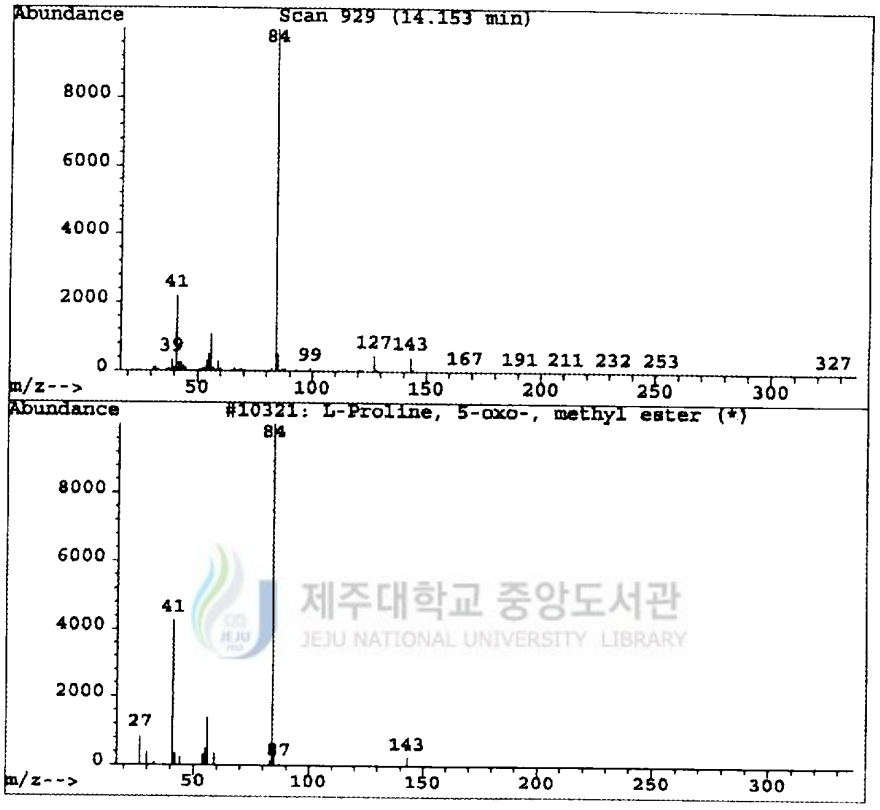


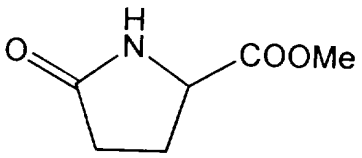
Fig. 16. GC spectra of MeOH fraction of 50% MeOH extract from *Hizikia fusiforme*

먼저, Chloroform 분획 성분을 살펴보면, 14.153min 에 나타난 피크는 L-proline, 5-oxo-methyl ester 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 17 이고 그 구조는 다음과 같다.

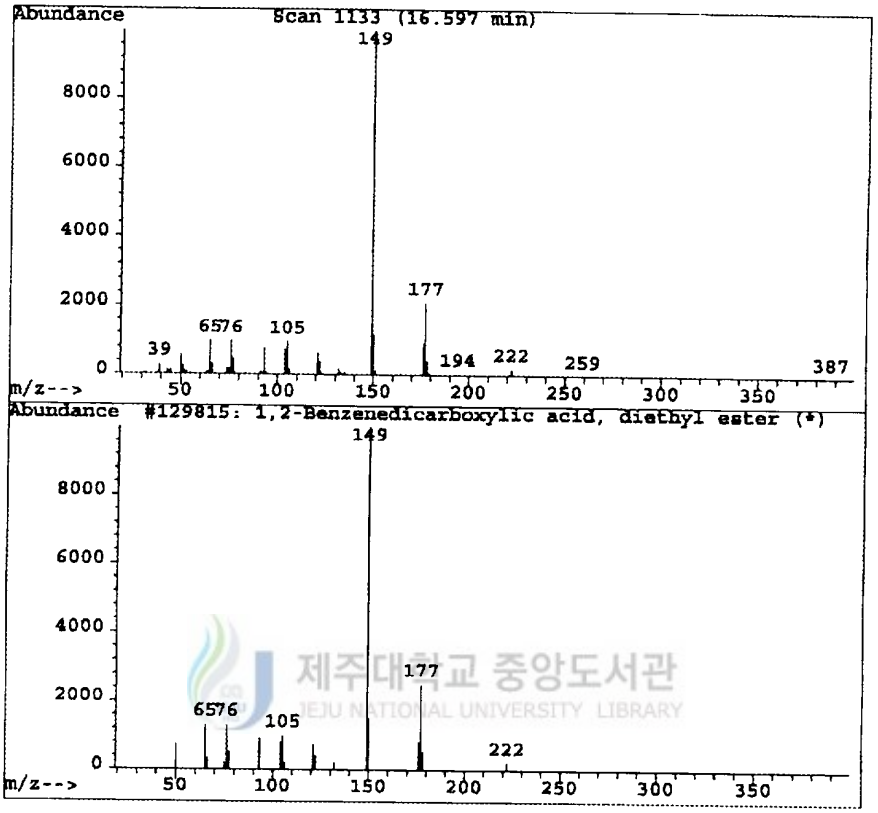


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 17. MS spectra of 14.153 min peak of GC

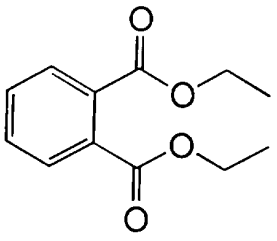


16.597 min 에 나타난 피크는 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester 인 것으로 나타났으면 MS data는 figure 18 이고 그 구조는 다음과 같다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig 18. MS spectra of 16.597 min peak of GC



18.814 min 에 나타난 피크는 (-)-loliolide 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 19 이고 그 구조는 다음과 같다.

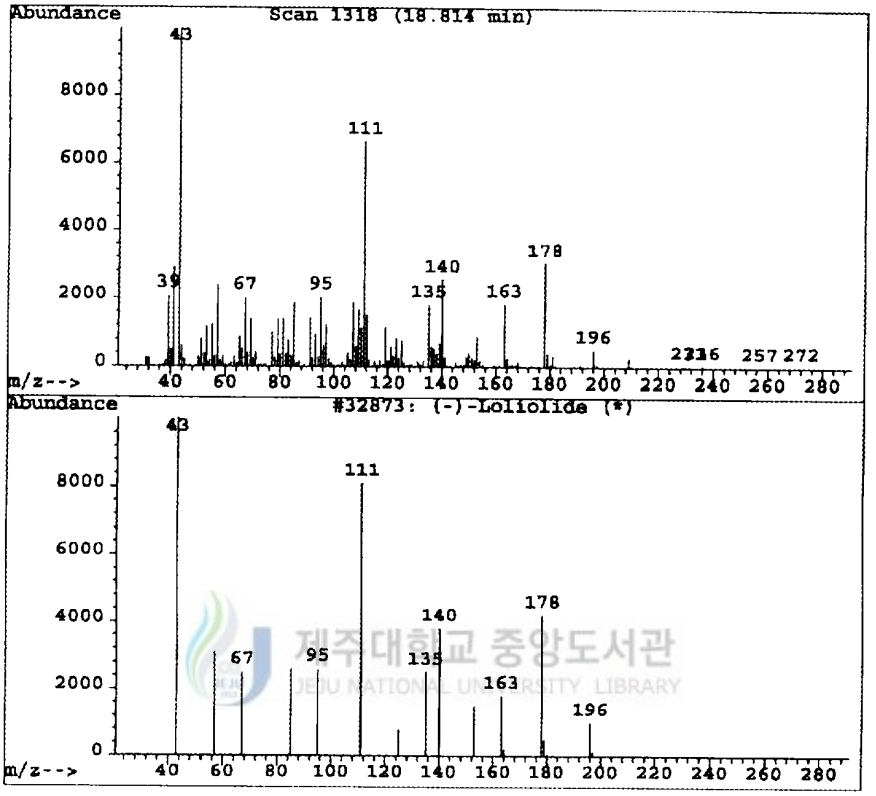
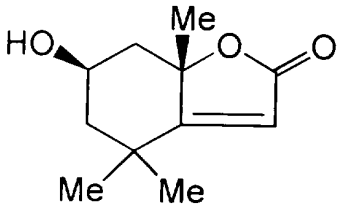


Fig. 19. MS spectra of 18.814 min peak of GC



20.419 min에 나타난 피크는 hexadecanoic acid 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 20 이고 그 구조는 다음과 같다.

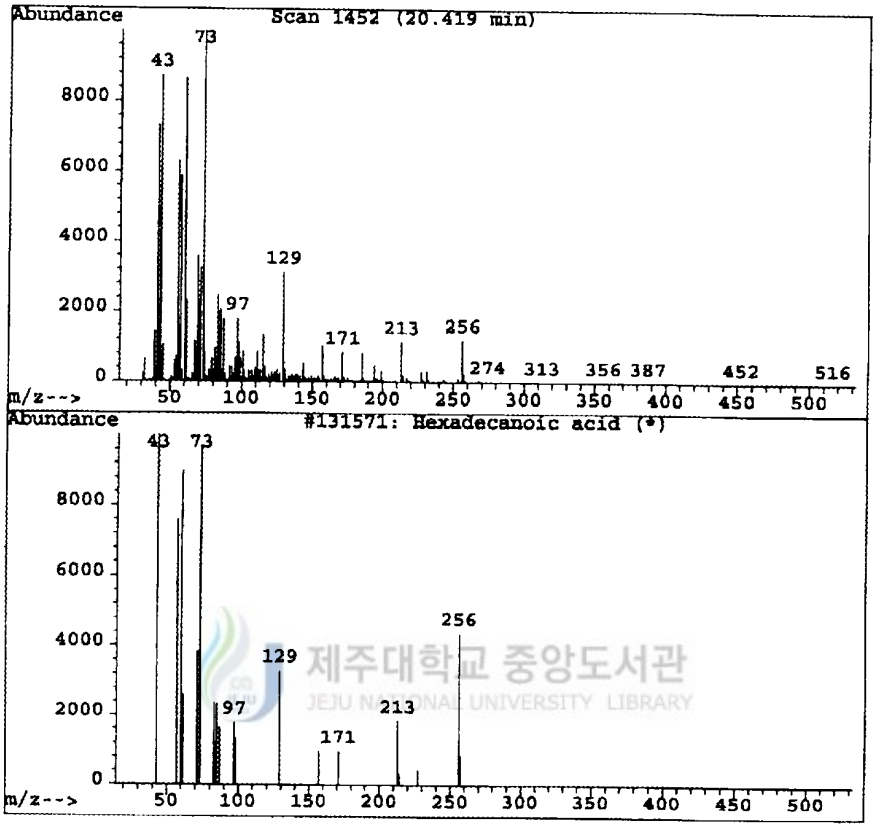
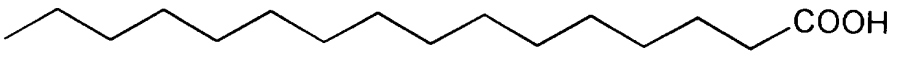
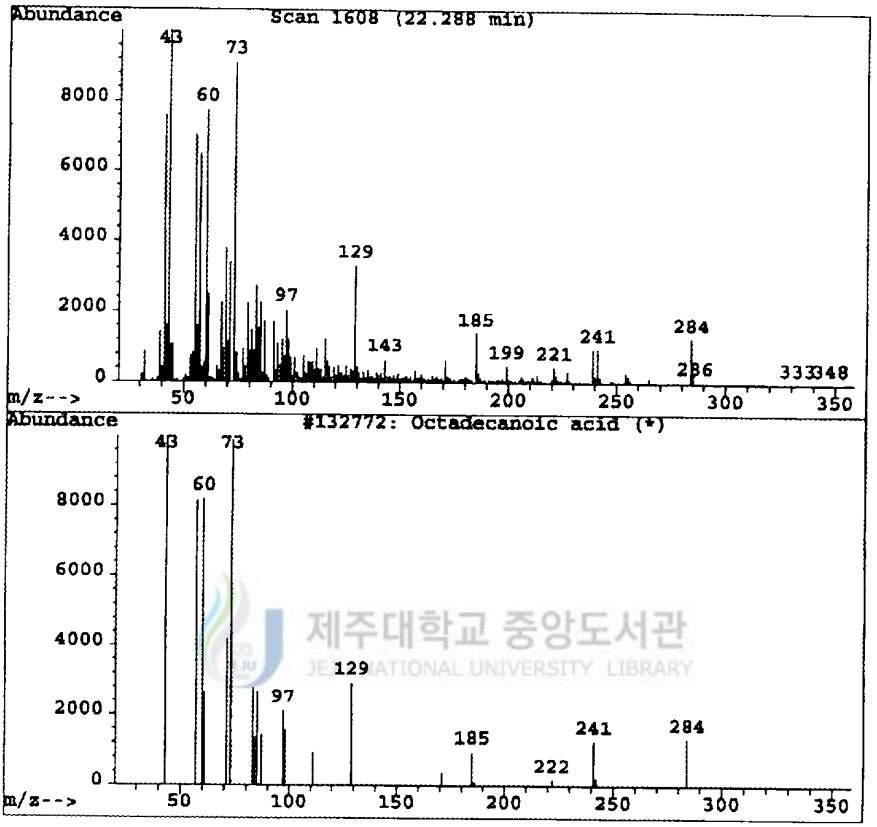


Fig. 20. MS spectra of 20.419 min peak of GC



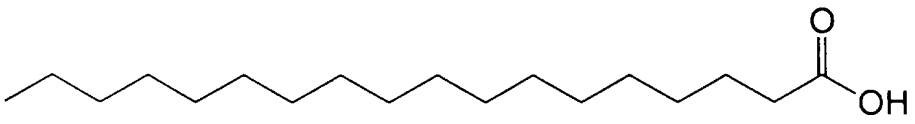
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

22.288 min에 나타난 피크는 octadecanoic acid 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 21 이고 그 구조는 다음과 같다.

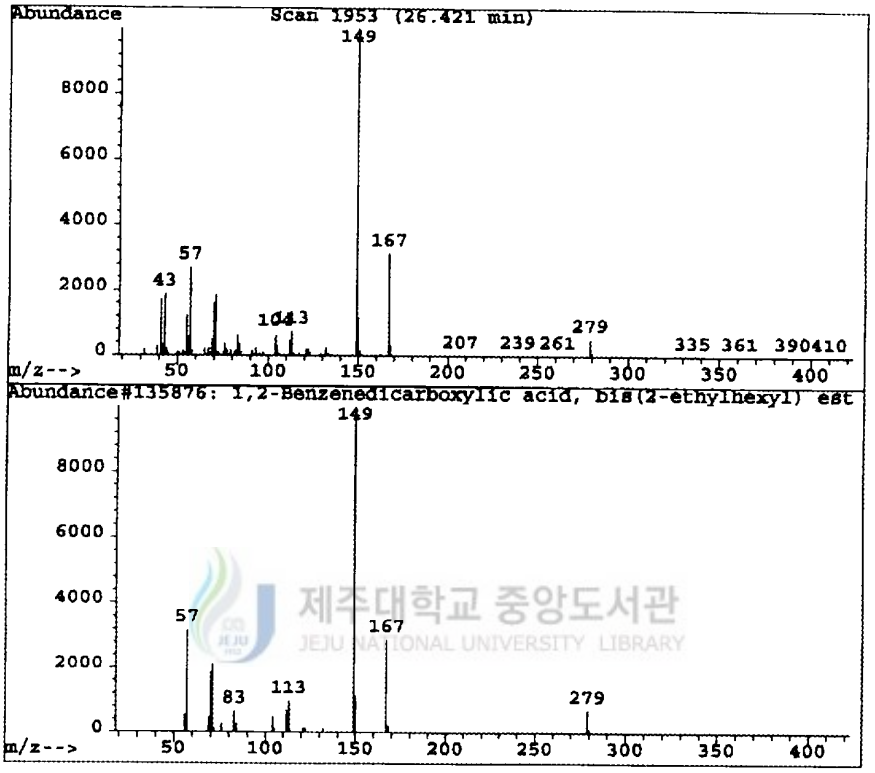


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 21. MS spectra of 22.288 min peak of GC

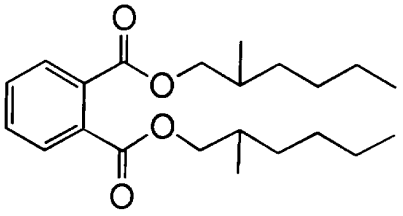


26.421 min 에 나타난 피크는 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl)ester 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 22 이고 그 구조는 다음과 같다.

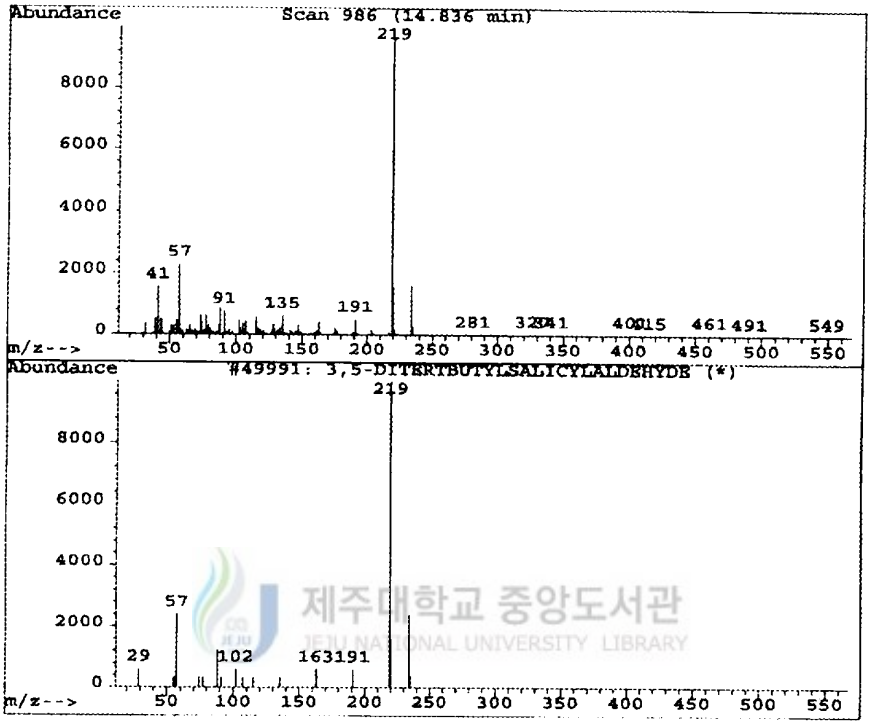


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 22. MS spectra of 26.421 min peak of GC

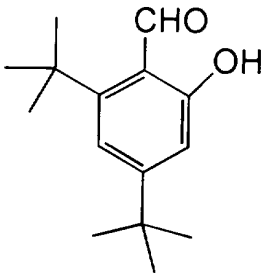


다음으로 TMS 유도체화한 MeOH 분획에 대한 data를 살펴보면 다음과 같다. 14.836 min 에 나타난 피크는 3,5-Ditertbutylsalicylaldehyde인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 23 이고 그 구조는 다음과 같다.

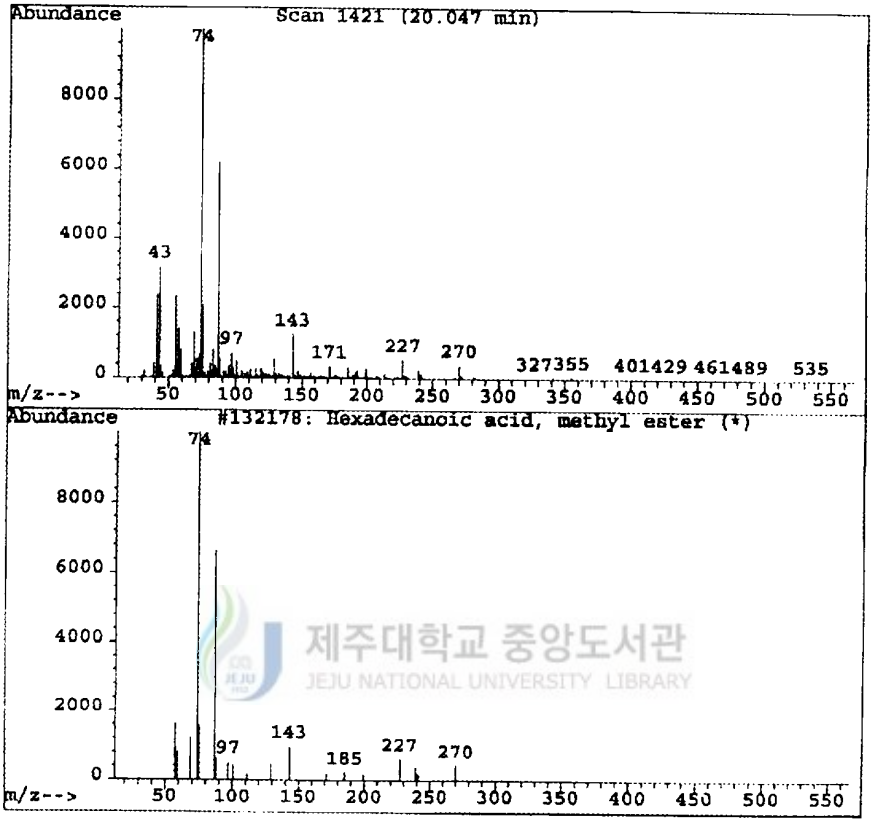


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 23. MS spectra of 14.836 min peak of GC

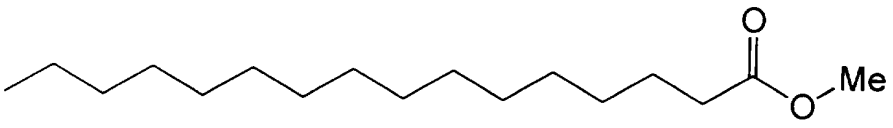


20.047 min에 나타난 피크는 hexadecanoic acid, methyl ester 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 24 이고 그 구조는 다음과 같다.

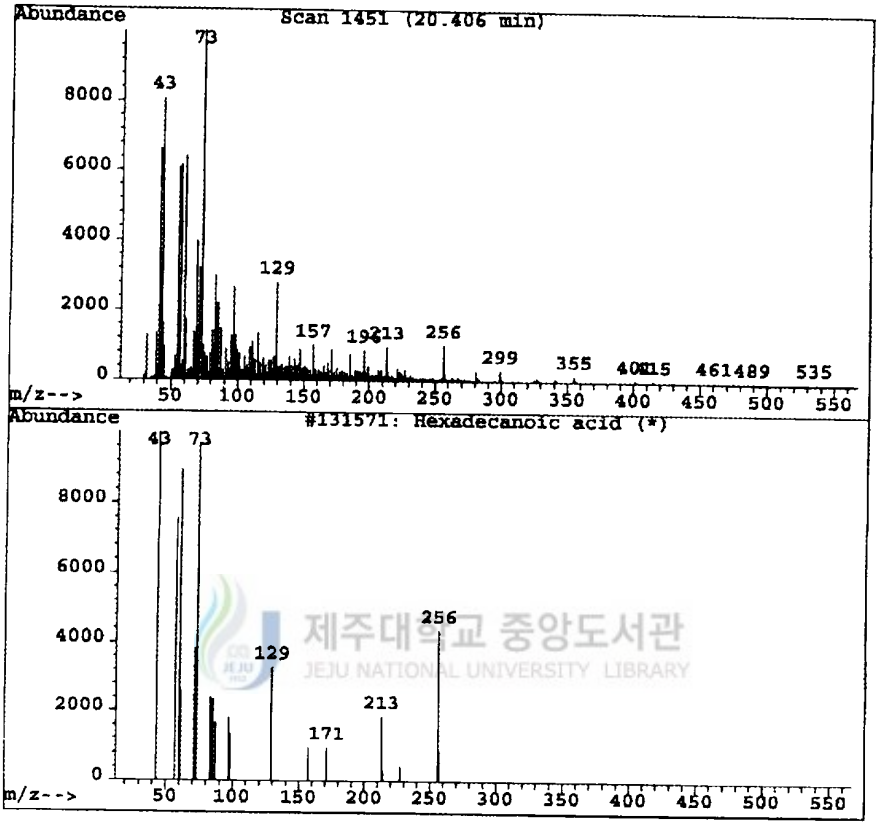


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 24. MS spectra of 20.047 min peak of GC

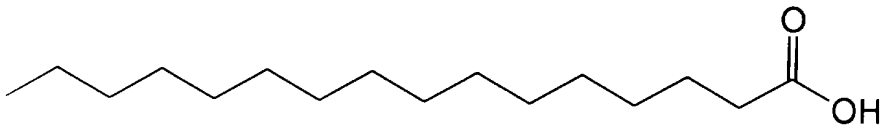


20.406 min 에 나타난 피크는 hexadecanoic acid 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 25 이고 그 구조는 다음과 같다.

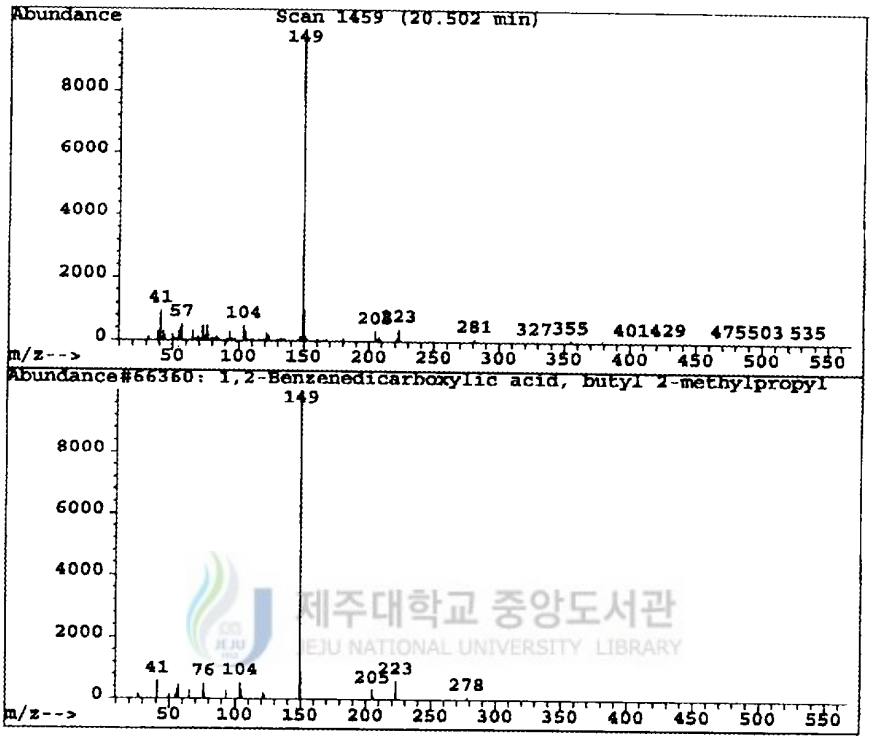


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 25. MS spectra of 20.406 min peak of GC

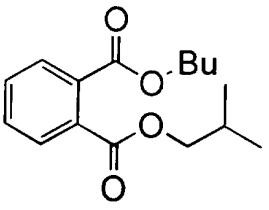


20.502 min에 나타난 피크는 1,2-benzenedicaboxylic acid, butyl 2-methyl propyl ester 인 것으로 나타났으며 MS data는 figure 26 이고 그 구조는 다음과 같다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 26. MS spectra of 20.502 min peak of GC



Ⅳ. 결 론

46종의 해조류에 대한 항산화 활성을 측정한 결과 갈조류가 녹조류와 홍조류에 비하여 높은 항산화 활성을 가진 종이 많이 있음을 알 수 있었다. 특히, 갈조류 중의 모자반류는 뛰어난 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 톳에서부터의 추출물에 대한 항산화 활성을 조사한 결과 추출방법 1 에서는 *n*-BuOH 분획이 추출방법 2 에서는 50% MeOH 추출물에 대한 항산화 활성($\triangle A_{517nm}$)이 각각 0.52, 0.82로 활성이 좋은 것으로 나타났으며 특히 50% MeOH 추출물은 굉장한 활성을 보였다. 이 분획에 대하여 HPLC로 확인한 결과 *n*-BuOH 분획은 8개의 피크가 50% MeOH 추출물은 2개의 피크가 나타났다. 이 것은 여러개의 피크가 모여 피크군을 형성한 것으로 생각된다. 이러한 것으로 미루어 보아 이 분획 및 추출물 중의 항산화 활성을 가지는 물질은 극성이 큰 물질로 보아진다. 그리고 50% MeOH 추출물을 다시 H_2O, MeOH, 50% MeOH 분획으로 나누어서 항산화 활성을 측정한 결과 모든 분획에서 활성이 있는 것으로 나타났으며 MeOH 분획이 다른 분획에 비하여 좋은 활성을 보였다. 이 결과로 MeOH 분획이 50% MeOH 추출물의 활성에 큰 비중을 차지하고 있으며, 또한 다른 분획도 추출물의 활성에 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다. 50% MeOH 추출물중 유효성분을 GC/MSD를 사용하여 분석한 결과 지방산과 그 유도체가 있는 것으로 확인되었고 특히, chloroform 분획중 가 18.814 min인 피크의 물질을 Mass dectector로 분석하여 library spectrum 과 비교한 결과 (-)-loliolide임이 확인 되었다. (-)-loliolide는 이미 알려져 있는 세포독성 물질로, 해조류로부터는 갈조류인 모자반(*Sargassum crasifolium*)과 Stockeyia indica 로부터 발견되었다.[37,38] 이 보고 이외에는 (-)-loliolide를 해조류로부터 분리한 적이 없으며, 특히 시료인 톳으로 부터 존재가 확인된 바는 없는 것으로 생각된다. 따라서, 식용되고 있는 톳으로부터 생

제주대학교 중앙도서관

리활성 성분인 Loliolide 및 그 유도체들의 분리 동정이 계속 연구되어야 한다고 생각된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 참 고 문 헌

1. 박선민 *호서대학교 기초과학연구논문집*, 1997, 제5집 1호, 89-103.
2. Potter, N. *Food Sciene*, **1978**, 697
3. Buck, D. F. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, March, 275.
4. Branen, A. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1975**, 52, 59.
5. Fujimoto, K. and Kaneda, T. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **1980**, 46, 1125.
6. Burton, G. W. *J. of Nutrition*, **1989**, 119, 109.
7. Igarashi, K. Takanashi, K. Makino, M. and Yasui, T. *Nippon Sho -kuhin Kogyo Gakkishi*, **1989**, 36, 852.
8. Ramarathnam, N. Osawa, T. Namiki, M. and Kawakishi, S. *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 37, 316.
9. Ramarathnam, N., Osawa, T. Namiki, M. and Kawakishi, S. *J. Ag -ric. Food Chem.*, **1988**, 36, 732.
10. 이근계 *상명여대 논문집*, **1982**, 10, 425.
11. 김상달, 도재호, 오훈일 *한국농화학회지*, **1981**, 24, 161.
12. 위재준, 박종대, 김만욱,이형주 *한국농화학회지*, **1989**, 32(1), 44-49.
13. Soliman, M. A. EL-Sawy, A. A. Fadel, H. M. and Osman, F. *J. Ag -ric. Food Chem.*, **1985**, 33, 523.
14. 김은희, 김동주 *한국식품과학지*, **1981**, 13, 283.
15. Shin Ya, K. et al *J. Antibiotics*, **1990**, 43, 1337.
16. Teshima, Y., Shin Ya,K. et. al *J. Antibiotics*, **1991**, 44(6), 685.
17. Mo, C. J., Shin Ya, K. et al *J. Antibiotics*, **1990**, 43, 1337.
18. Yasumoto, T., Murata, M. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1897.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

19. Kobayashi, J. Ishibashi, M. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1753.
20. Miyashta, K. Takagi, T. *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, 51(11), 315.
21. Kaneniwa, M. Itabashi, Y. Tagagi, T. *Nippon Suisan Gakka-shi*, **1987**, 53, 861.
22. Nishibori, S. Namiki, K. *家政學雜誌*, **1985**, 36(11), 17-22.
23. Kameda, T. and Ando, H. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1981**, 7, 553.
24. Fujimoto, K. and Kaneda, T. *Hydrobiologya*, **1984**, 116.
25. 박재한, 강규찬, 백상봉, 이윤형, 이규순 *한국식품과학회지*, **1991**, 23(3), 256.
26. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 *Korean J. Food Sci. Technol.* , **1994**, 26 , 417-421.
27. *수산계*, **1996**, 6-7, 101.
28. 오윤식,이인규,부성민 *The Korea J. of phycology*, **1990**, 5(1), 57-71.
29. Blois, M. S. *Nature*, **1958**, 181, 1199.
30. Hirota, A. Morimitsu, Y. and Hojo, H. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1997**, 61(4), 647-650.
31. *Japan Patent* 平2-245087(공개 1990. 9.28).
32. Numata, A. Kanabara, S. Takahashi, C. Fujiki, R. Yoneda, M. Usami, Y. Fujita, E. *phytochemistry*, **1992**, 31, 1209.
33. 花王(Kao)주식회사, *Japan Patent* 平4-49259 (공개 1992. 2.18).
34. *Japan Patent* 平6-340621 (공개 1994. 12.13).
35. *Japan Patent* 平7-82554 (공개 1995. 3.28).
36. Edmond, J. S. Morita, M. Shibata, Y. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* ,**1987**, 577.
37. Kuniyoshi, Masayuki, *Bull. Coll. Sci., Univ. Ryukus*, **1985**, 40, 41-52
38. Atta-Ur-Rahman Shah, Z. Choudhary, M. I. Abbas, S. A. Shameel,

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY