

해산 식물 추출물의 항산화 활성

서영완*, 이희정¹, 김유아, 박기의, 정현아¹

¹한국해양대학교 해양과학기술연구소, 한국해양대학교 해양과학부

Antioxidizing Activity of Organic Extracts from Marine Plants

Youngwan Seo*, Hee-Jung Lee¹, You Ah Kim, Ki Eui Park and Hyun-Ah Jung¹

Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan, 606-791, Korea

¹Research Institute of Marine Science and Technology(RIMST),
Korea Maritime University, Busan, 606-791, Korea

ABSTRACT

The crude extracts of 53 marine plants were screened for scavenging effects on superoxide anion and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radicals. In our measurement, 4 species of seaweeds and 6 species of salt marsh plants exhibited dose-dependent effect for scavenging DPPH radical. The methanolic extracts of seaweeds *Symphocladia latiuscula*, *Gloiopeltis furcata*, *Sargassum thunbergii*, and *Sargassum* sp. revealed the inhibition of 85.82%, 82.83%, 74.05%, and 63.99% against DPPH radical, respectively. Also, among extracts of the salt marsh plants tested, *Rosa rugosa*, *Artemisia capillaris*, *Erigeron annuus*, and *Ixeris tamagawaensis* showed significant scavenging effects on DPPH radical in order. However, most of marine plants little exhibited the superoxide (SOD) dismutase-like ability. The MeOH extracts of seaweeds *Gigartina tenella*, *Colpomenia bullosa*, *Gloiopeltis furcata*, *Halymenia acuminata*, *Corallina pilulifera*, and *Gymnogongrus flabelliformis*, together with the CH₂Cl₂ extracts of salt marsh plants *Rosa rugosa*, *Lactuca indica*, *Suaeda japonica*, and *Imperata cylindrica*, showed very weak superoxide dismutase-like activities.

Key words: Marine plants, Seaweeds, Salt marsh plants, DPPH radical, Superoxidase dismutase-like activity

1. 서론

천연물로부터 생리 활성 물질을 추출하고 분리 정제하여 일상 생활에 유용하게 적용시키고자 하는 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 이러한 천연물로부터 제조된 생리 활성 물질 또는 의약품들은 합성하여 제조된 의약품에 비해 비교적 생체에 대한 안정성이 높아 매우 유리한 장점이 있다. 합성 의약품들은 단기적인 치료

효과가 매우 높다 할지라도 반대 급부인 인체에 독성이거나 치료 후유증이 있는 등의 부작용이 있어 많은 문제가 되고 있다. 천연물 중에서도 주로 육상의 식물체 및 미생물에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔으며 1970년 후반부터는 해양 생물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재 세계적으로 해조류가 가장 많이 이용되고 있는 분야로서는 해조류에 풍부한 alginic acid, agar, carrageenan 같은 성분들이 사용되는 콜로이드성 추출물의 원료 분야이다(1, 2) 또한, 해조류에는 다당류와 무기질 그리고 비타민이 풍부하고, 독특한 맛과 향을 가지고 있어 식용으로도 이용되고 있다. 그리고 cellulose, lignin 등의 생리 활성 식이 섬유소를 많이

*Corresponding author: Youngwan Seo
Tel: 051-410-4328, FAX: 051-404-3538
E-mail: ywseo@hhu.ac.kr

함유하고 있어 옛날부터 암의 치료로 사용되어 왔고, 특히, 아시아 지역에서는 해조류 추출물을 해열제나 외상 통풍, 담석증, 고혈압, 설사, 화상, 위궤양 등의 다양한 질환의 치료제로 사용되어 왔다(3,4).

호기성 생물체의 모순은 생명에 필수불가결한 공기가 또한 죽음의 독소가 될 수 있다는 것이다. 활성 산소(ROS; reactive reactive species)는 세포막의 지질과산화물 유발하고, 그 결과로써 생성된 과산화분해물이 DNA나 RNA 단백질막 조직에 작용하여 질환을 여러 가지 질환을 유발시킨다(5-7). 그러나 인간을 비롯한 모든 생물체들은 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지를 발생하는 과정에서 활성산소(superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical)들의 상해에 대한 근본적인 자기 방어기구를 가지고 있다. 예를 들어 superoxide dismutase (SOD)는 superoxide를 hydrogen peroxide로 전환시킨다. hydrogen peroxide를 제거하는 catalase는 대부분의 조직의 peroxisome에서 발견된다. 따라서 catalase는 peroxisomal oxidase 효소에 의해 생성된 과산화물(peroxide)을 제거하는 것으로 보인다. 그 중에서도 glutathione peroxidase는 세포질이나 미토콘드리아에서 SOD에 의해 생성된 hydrogen peroxide를 제거하는 중요한 효소이다(8). 이러한 항산화 방어 체계가 있다하더라도 유리 라디칼에 의해 손상된 단백질이나 DNA와 산화된 지방산들을 제거하는 수선 효소(repair enzyme system)들이 있다. 그리고 이렇게 제거된 분자들은 노로 배설되게 된다. 또한 내인성 항산화 체계뿐만 아니라 식이로부터 섭취할 수 있는 외인성 항산화제들도 있다. 특히, 과일이나 채소에 풍부한 항산화제들은 심혈관계 질환이나 몇 가지 종류의 암을 치료하는 효능이 있다고 알려져 있다(9,10).

본 연구에서는 삼면이 바다인 우리나라에서 풍부하게 얻을 수 있는 해조류와 토양의 염분 농도가 매우 높은 지역에 서식하고 있는 염생 식물을 대상으로 우수하고도 안정한 항산화제를 발견할 목적으로 DPPH 유리 라디칼 소거 활성과 superoxide anion을 생성하는 pyrogallol 방법을 이용한 superoxide anion-like activity를 측정하여 53종의 해양 생물에 대한 항산화 효과를 검색하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재 료

본 실험에서 사용한 20종의 염생 식물은 경기도 대부도, 경상북도 포항, 경상남도 거제도에서 2002년 8~9월에 채집하였으며, 33종의 해조류는 2002년 12월에서 2003년 2월 제주도의 귀덕, 성산포, 경상남도 기장군, 영도 중리에서 채집하였다. 실험에 사용된 해

조류 시료는 해수로 씻은 후 종류별로 분류하고 냉동 보관되어졌으며, 각 종에 대한 표본은 한국해양대학교 해양과학기술연구소 표본실에 보관하고 있다.

2.2. 시료 추출물 제조

채집한 해조류들은 사용하기 전에 -25°C 의 냉동고에 보관하였다가 해빙하여 짧게 자른 후에 먼저 acetone과 methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 해조류가 충분히 잠기도록 하여 24시간 동안 방치한 후 여과하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40°C 수욕상에서 진공 회전 농축기(EYELA JAPAN)로 농축하여 acetone/methylenechloride 추출물을 얻었다. 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 2회 반복하여 각각 acetone/methylenechloride 추출물과 methanol 추출물의 해조 추출물 시료를 제조하였다.

모든 염생식물은 그늘에서 저온(37°C) 건조하였고 추출에 적합하도록 세절한 후 추출관에 넣고 CH_2Cl_2 와 MeOH로 연차적으로 각각 추출하였다. 각각의 시료 50g에 CH_2Cl_2 (시약용 1급)을 가하여 침지하였다. 24시간 방치한 후에 여과하고 잔사에 다시 CH_2Cl_2 를 가하여 24시간 후 여과하였다. 그리고 남은 잔사에 MeOH(시약용 1급)을 가하여 24시간 침지한 후 여과하는 과정을 2회 반복 실행하였다. 얻은 각각의 CH_2Cl_2 추출여액과 MeOH 추출여액을 40°C 수욕상에서 진공 회전 농축기(EYELA, JAPAN)로 농축한 후 건조하여 냉장보관하면서 CH_2Cl_2 와 MeOH 시료로 사용하였다.

2.3. DPPH 자유 라디칼에 대한 전자 공여능 측정(11)

DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹인 용액 1.2 ml에 다시 EtOH 3 ml과 DMSO 0.5 ml을 혼합한다. 그리고 시료(f.c. $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl 와 제조한 DPPH용액을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94~0.97이 되도록 조정하였다. 그리고 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다

EDA(electron donating ability)(%) = [(대조군 흡광도 - 실험군 흡광도) / 대조군의 흡광도] \times 100

2.4 Superoxide dismutase-like activity 측정(12)

SOD 유사 활성 물질은 Marklund와 Marklund의 방법에 따라서 각 시료 0.2 ml에 tris-HCl buffer(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml와 7.2×10^{-3} M pyrogallol 0.2 ml를 가하고 25°C 에서

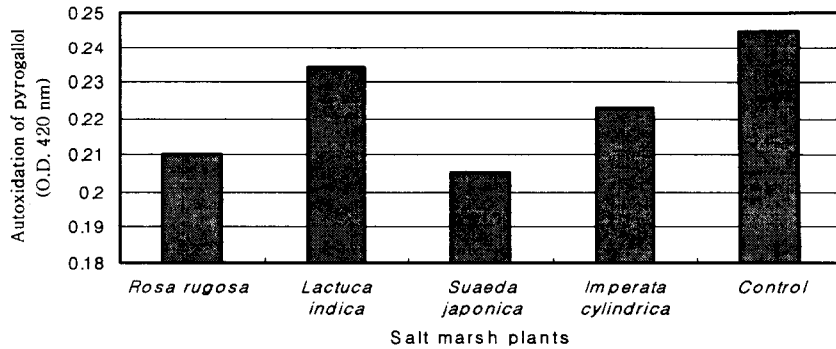


Fig. 1. Autoxidation of pyrogallol in salt marsh plants CH₂Cl₂ extracts of 1 mg/ml concentrations.

10분간 방치한 후 1 N HCl 1 ml로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 해산 식물 추출물의 SOD 유사 활성(SOD-like activity)

다양한 조건하에 인체는 hydroxyl radical(OH·)과 superoxide anion(O₂⁻)을 생성한다. 신체내의 몇몇 분자들은 직접적으로 산소와 반응하여 superoxide를 만들기도 한다. 이러한 superoxide 생성은 설명하기에 다소 어렵다.

만성 염증이 진행되는 동안 정상적인 보호 기전의

분의 분자들이 래디칼이 아니라 할지라도, 유리래디칼이 비래디칼과 반응하였을 때 유리 래디칼 사슬 반응의 결과, 새로운 래디칼들이 만들어지고 세포막이나 지단백질과 반응함으로써 지질 과산화를 일으키게 된다. 이러한 산화 과정은 혈관의 손상과 피부 노화와 밀접한 관련이 있다. 본 연구에서 사용한 pyrogallol의 자동산화물을 이용한 SOD의 활성은 xanthine oxiase에 의한 cytochrome c의 환원에 의한 실험 방법만큼이나 민감한 것으로 보고되어 있다(14).

SOD (superoxide dismutase)는 생체내에서 superoxide anion의 소거에 관여하는 효소이며, 이러한 활성산소는 생체내에서 산화적 장애를 초래하게 되

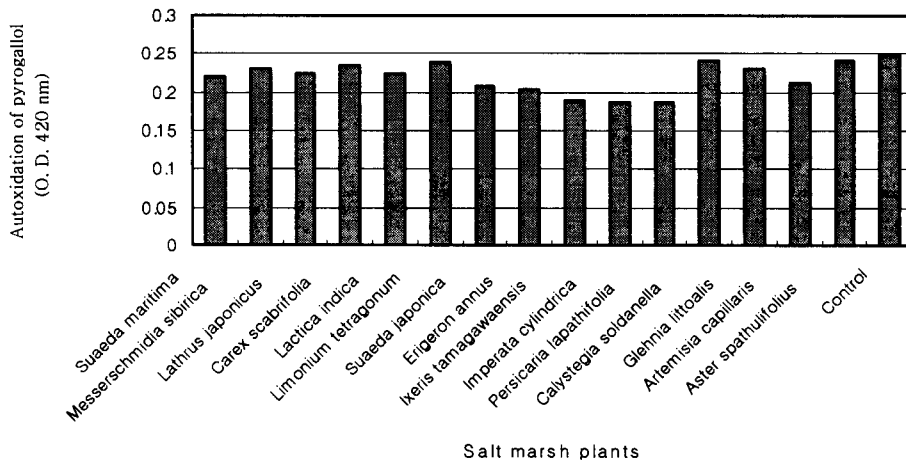


Fig. 2. Autooxidation of pyrogallol in salt marsh MeOH extracts of 1 mg/ml concentrations.

활동이 정지하게 된다. 흡입하는 산소의 1~3% 정도가 superoxide를 만들어낸다. 인간은 아주 많은 양의 산소를 소비하기 때문에, 일년에 체내에서 약 2 kg 이상을 생산한다. 만성적인 염증을 가진 사람들은 더욱 더 많은 superoxide anion을 생산하게 된다. 체내의 대부

므로 이런 현상을 억제하는 물질을 찾기 위해서 SOD-like activity를 측정하였다. 4종(*Rosa rugosa*(해당화), *Lactuca indica*(왕고들빼기), *Suaeda japonica*(칠면초), *Imperata cylindrica*(띠))의 dichloromethane 추출물과 15종의 methanol 추출물

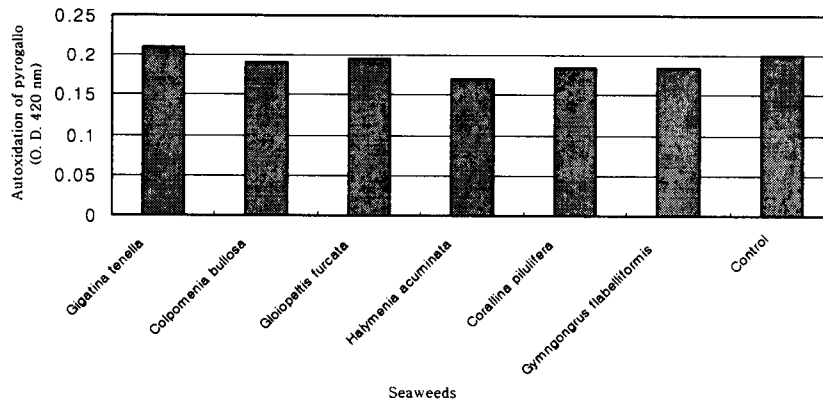


Fig. 3. Autoxidation of pyrogallol in seaweeds MeOH extracts of 1 mg/ml contrations.

에서 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 비교적 약한 pyrogallol의 자동 산화 반응을 억제시키는 것을 확인하였다(Fig. 1, 2). 또한, 6종의 해조류 즉, 돌가사리 (*Gigartina tenella*), 긴불레기말(*Colpomenia bulbosa*), 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*), 지누아리사촌(*Halymenia acuminata*), 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*), 부챗살(*Gymnogongrus flabelliformis*)의 methanol 추출물에서 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 비교적 약한 pyrogallol 자동산화 반응을 억제시

키는 것을 확인하였다(Fig. 3).

3.2 해산 식물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 효과

DPPH 라디칼에 대한 전자공여능을 측정한 결과 해당화(*Rosa rugosa*), 사철쭉(*Artemisia capillaris*), 개망초(*Erigeron annus*), 넷씀바귀(*Ixeris tamagawaensis*), 범행초(*Tetragonia tetragonoides*)의 MeOH 추출물이 100 µg/ml(f.c.) 농도에서 각각 87.51%, 88.67%, 78.49%, 69.99%, 58.66%의 소거

Table 1. DPPH radical scavenging effect of salt marsh plants extracts(100 µg/ml)

Plants	MeOH ext.	CH ₂ Cl ₂ ext.
<i>Messerschmidia sibirica</i> (모래지치)	14.27	10.39
<i>Lathyrus japonicus</i> Willdenow(갯완두)	6.30	12.49
<i>Carex scabrifolia</i> (천일사초)	10.39	12.49
<i>Rosa rugosa</i> (해당화)	87.51	7.97
<i>Lactuca indica</i> Linne(왕고들빼기)	6.72	7.24
<i>Limonium tetragonum</i> (갯질경이)	16.79	16.16
<i>Erigeron annus</i> (개망초)	78.49	29.59
<i>Suaeda asparagoides</i> (나문재)	7.56	5.14
<i>Suaeda japonica</i> (칠면초)	7.24	7.35
<i>Ixeris tamagawaensis</i> (넷씀바귀)	69.99	9.76
<i>Imperata cylindrica</i> (띠)	23.29	15.63
<i>Persicaria lapathifolia</i> (흰명주아귀)	7.14	5.46
<i>Calystegia soldanella</i> (갯메꽃)	9.02	11.54
<i>Glehnia littoralis</i> (갯방풍)	33.68	8.71
<i>Tetragonia tetragonoides</i> (범행초)	58.66	39.87
<i>Aster spathulifolius</i> (해국)	9.02	6.09
<i>Salicornia herbacea</i> (합초)	18.39	18.26
<i>Artemisia capillaris</i> (사철쭉)	88.67	54.67
<i>Salsola komarovii</i> (수송나물)	6.72	8.39
<i>Suaeda maritima</i> (해홍나물)	14.57	
α -tocopherol	92.13	
L-ascorbic acid	96.33	

율을 나타내었다(Table 1). 그러나 CH_2Cl_2 추출물은 $100 \mu\text{g/ml}$ (f.c.) 농도에서 사철쭉(54.67%)의 시료를 제외하고는 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. 따라서 염생 식물에 의한 DPPH 래디칼의 소거 효과가 비교적 극성이 큰 화합물이 많이 포함되어 있는 MeOH 추출물에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한 DPPH 구조에 전자를 하나 공여하고서도 비편재화된 안정한 구조를 유지할 수 있는 phenolic 구조의 화합물들에 의해 래디칼 소거가 일어날 것이라 생각된다. 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid(96.33%)나 α -tocopherol(92.13%)보다는 다소 떨어지지만 강력한 DPPH 소거 효과를 가지는 해당화(87.52%)와 개망초(78.49%)의 MeOH 추출물은 CH_2Cl_2 추출물에서는 각각 7.97%, 29.59%로서 매우 약한 DPPH 래디칼 소거 활성을 나타내었다. 그러나 사철쭉은 MeOH 추출물(88.67%)보다는 다소 약한 활성이기는 하지만, CH_2Cl_2 추출물에서도 54.67%의 DPPH 래디칼의 소거 활성이 확인되었다. 그리고 범행초는 MeOH 추출물과 CH_2Cl_2 추출물에서 각각 58.66% 39.87%의 비교적 양호한 DPPH 래디칼 소거 활성이 있었다.

33종 해조류의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물과 methanol 추출물에 대해서 DPPH 래디칼 소거 활성능을 측정하였다. 보라우무(*Symphyclocladia latiuscula*)의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물은 $100 \mu\text{g/ml}$ (f.c.)의 농도에서 85.82%의 DPPH 래디칼 소거활성이 있었으며, methanol 추출물에서는 56.83%의 소거활성이 나타났다. 그리고 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*) acetone/methylenechloride(1:1) 추출물은 82.83% 인데 반해 methanol 추출물은 20.19%의 매우 약한 래디칼 소거 활성을 보여주었다. 또한, 지층이(*Sargassum thunbergii*)의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물도 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 74.05%의 우수한 DPPH 래디칼 소거활성이 관찰된 반면 methanol 추출물에서는 14.2%로서 거의 소거효과가 없는 것으로 나타났다. 그리고 모자반(*Sargassum* sp.)의 경우는 methanol 추출물에서 63.99%의 비교적 양호한 소거 효과가 관찰되었다. 이것은 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid(96.64%)의 효과보다는 다소 떨어지지만 합성 항산화제인 BHT(55.08%)의 효과보다는 강한 것이었다. 그 외 실험한 해조류 추출물에서는 DPPH 래디칼 소거 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다(Table 1). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 래디칼을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되는 방법이다. DPPH alcohol용액은 518 nm에서 강한 UV 흡수가 있으며, 실온에서 1시간 정도는 매우 안정한 유리 래디칼이다. 전자공여체로부터 전자나 hydrogen radical을

받아 phenoxy radical을 생성하게 됨으로써 518 nm에서 나타났던 DPPH의 특이적인 흡수 band가 사라지게 된다. 가시적인 DPPH의 보라색은 안정해진 분자의 물수에 비례하여 노란색으로 변하게 된다. 이러한 DPPH는 dioxane이나 CCl_4 와 같은 비극성 용매 내에서는 2차, 3차 산화 반응이 일어나기도 하나 alcohol 용액 내에서는 비교적 안정하다. 왜냐하면 DPPH의 질소 원자와 alcohol간에 수소 결합이 형성되기 때문이다(13).

4. 결 론

본 연구에서는 20종의 염생식물의 methanol과 dichloromethane추출물과 33종 해조류의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물과 methanol 추출물에 대해 DPPH 래디칼 소거 활성을 측정하였다.

그 결과 사철쭉(*Artemisia capillaris*), 해당화(*Rosa rugosa*), 개망초(*Erigeron annuus*), 넷씀바귀(*Ixeris tamagawaensis*), 범행초(*Tetragonia tetragonoides*), 의 methanol 추출물에서 각각 88.67%, 87.51%, 78.49%, 69.99%, 58.66%의 강력한 DPPH 래디칼 소거 효과를 나타내었다. 또한 보라우무(*Symphyclocladia latiuscula*)의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물(85.82%), methanol 추출물(56.83%)과 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*)와 지층이(*Sargassum thunbergii*)의 acetone/methylenechloride(1:1) 추출물이 각각 82.83%, 74.05%였고, 모자반(*Sargassum* sp.)의 methanol 추출물이 63.99%였다. 이것은 대조군으로 사용한 천연의 항산화제로 잘 알려진 α -tocopherol과 L-ascorbic acid의 92.13%나 96.33%의 활성보다는 낮은 것이었지만 유의적인 유리 래디칼 소거효과였다. 그리고 pyrogallol의 자동산화를 이용한 superoxide dismutase의 유사활성의 측정은 비교적 매우 약한 효과를 보였다. 4종(*Rosa rugosa*; 해당화, *Lactuca indica*왕고들빼기, *Suaeda japonica*; 철면초, *Imperata cylindrica*; 락)의 염생식물의 dichloromethane 추출물과 15종의 염생식물 methanol 추출물 그리고 6종(*Gigartina tenella*; 돌가사리, *Colpomenia bullosa*; 긴불레기말, *Gloiopeltis furcata*; 불등풀가사리, *Halymenia acuminata*; 지누아리사촌, *Corallina pilulifera*; 작은구슬산호말, *Gymnogongrus flabelliformis*; 부챗살)의 해조류 methanol 추출물에서 그 SOD 유사활성이 확인되었다.

Table 2. DPPH radical scavenging effects of Seaweed extracts of a 100 $\mu\text{g/ml}$ concentration (EDA(%))

Seaweeds	CH ₂ Cl ₂ +Acetone ext.	MeOH ext.
녹조류 (Green algae)		
<i>Codium adhaerens</i> (떡청각)	17.27	13.74
<i>Enteromorpha linza</i> (잎파래)	19.08	13.97
<i>Ulva pertusa</i> (구멍갈파래)	19.22	12.08
갈조류 (Brown algae)		
<i>Sargassum honerii</i> (괘쟁이 모자반)	21.96	18.83
<i>Sargassum confusum</i> (알송이 모자반)	21.50	5.59
<i>Colpomenia sinuosa</i> (불레기말)	21.54	21.12
<i>Colpomenia bullosa</i> (긴불레기말)	27.37	20.70
<i>Derbesia marina</i> (데르베시아)	19.56	16.65
<i>Hisikia fuziformis</i> (뚝)	14.88	17.59
<i>Dictyota dichotoma</i> (참그물바탕말)	19.46	16.55
<i>Sargassum thunbergii</i> (지충이)	74.05	14.20
<i>Scytosiphon lomentaria</i> (고리매)	17.70	15.18
<i>Sargassum sp.</i> (모자반)	12.29	63.99
홍조류 (Red algae)		
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> (부챗살)	22.58	19.98
<i>Carpopeltis cornea</i> (붉은 부챗살)	19.74	16.69
<i>Lomentaria catenata</i> (마디잘록이)	31.60	17.28
<i>Gelidium amansii</i> (우뚝가사리)	15.76	13.55
<i>Gigatina tenella</i> (돌가사리)	52.76	23.33
<i>Gigatina intermedia</i> (애기돌가사리)	17.02	11.65
<i>Lomentaria hakodatensis</i> (애기마디잘록이)	17.92	11.28
<i>Carpopeltis affinis</i> (까막살)	21.65	12.40
<i>Symphocladia latiuscula</i> (보라우무)	85.82	56.83
<i>Corallina spp.</i> (산호말)	19.30	18.66
<i>Halymenia acuminata</i> (지누아리사촌)	16.7	12.39
<i>Plocamium telfairiae</i> (참곱슬이)	31.22	21.75
<i>Gloiopeltis furcata</i> (불등풀가사리)	82.83	20.19
<i>Corallina pilulifera</i> (작은구슬산호말)	20.71	21.85
<i>Chondria crassicaulis</i> (개서실)	26.53	24.14
<i>Chondrus ocellatus</i> (진두발)	23.10	22.68
<i>Plocamium telfairiae</i> (참곱슬이)	28.15	20.67
<i>Pachymeniopsis lanceolata</i> (개도박)	23.41	25.39
<i>Porphyra suborbiculata</i> (둥근돌김)	16.7	13.03
<i>Grateloupia turuturu</i> (미끌도박)	13.45	14.09
L-ascorbic acid	96.64	
BHT	55.08	

감사의 글

이 논문은 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원 (KRF-2002-005-C00008)에 의하여 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Zhang, Q., Li, N., Liu, X., Zhao, Z., Li, Z and Xu, Z., 2004. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 339, in Press.
2. Ali, M. S., M. Jahangir, M. Saleem, M. K. Pervez, S. Hameed and V. U. Ahmad. 2000. Metabolites of marine algae collected from Karachi-coasts of arabian sea. *Natural Product Sciences*, 6(2), 61-65.
3. Sanchez-Machado, D. I., J. Lopez-Cervantes, J. Lopez-Hernandez and P. Paseiro-Losada. 2003. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds, *Food Chemistry*, in press.
4. Ruperez, P. 2002. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23-26.
5. Reiter, R. J., Tan. D. X. and Burkhardt S. 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline : amelioration with melatonin. *Mechanism of Aging and Development*, 123, 1007~1019.
6. Fridorich L. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-881.
7. Dreher, D. and F. Junod 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of cancer*, 32A(1), 3038.
8. Benzie, I. F. F. 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms, *European Journal of Nutrition* 39, 53-61.
9. Liebert, M., Licht, U., Bohm, V. 1999. Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Z lebensm Unters Forsch A*. 208, 217-220.
10. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang. P., Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
11. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199-1200.
12. Marklund, S. and Marklund, G. 1974, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, 469-473.
13. Ancerewicz, J., E. Migliavacca, P. A. Carrupt, B. Testa, F. Bree, R. Zini, J. P. Tillement, S. Labidalle, D. Guyot, A. M. Chauvet-Monges, A. Crevat, A. L. Ridant (1998), Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 25(1), 113-120.
14. Magnani, L., Gaydou, E. M. and Hubaud J. C. 2000. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion, *Analytica Chimica Acta.*, 411, 209-216.

