



Chlorophyll과 유도체의 항산화활성

이 경 애

식품기능연구본부

I. 서론

과일이나 야채의 식이 phytochemical의 섭취는 강력한 항산화활성에 의해 질병예방에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다. 항산화활성을 규명하여 원료를 검색하는 것은 지난 30년간 발표된 논문들의 많은 부분을 차지한다. 그러나 건강 증진이 비타민 C나 E, 카로티노이드, 폴리페놀 등과 같은 phytochemical에 의한 것인지 chlorophyll에 의한 것인지에 대해서는 인식의 차이가 있다. 그럼에도 대부분의 연구에서 chlorophyll은 천연에 가장 많은 색소임에도 간과되었다. 이러한 정보부족은 chlorophyll과 그 유도체를 정제된 형태로 얻기 어려움과 불안정성 때문에 분해되는 것에 따른 것이었다. 일본의 연구 그룹들은 빛의 존재하에서 chlorophyll의 pro-oxidant 활성을 처음 제시하였으며, 이것은 singlet-excited chlorophyll의 에너지가 산소로 전달되어 활성산소종을 형성하기 때문으로 설명된다. 그러나 동일한 연구자들은 또한 chlorophyll과 pheophytin이 암소에 저장된 식물식용유의 자체 산화를 막으며 hydrogen donation 기

작이 radical chain reaction을 파괴한다고 하였다. 또 그들은 porphyrin의 화학적 구조가 항산화활성에 중요한 것으로 보고하였다.

Wanasundara and Shahidi (1998)는 차 추출물의 chlorophyll이 marine oil의 산화에 pro-oxidant 효과를 나타낸다 하였다. Hoshina, Tomita, and Shioi (1998)는 chlorophyll이 metal free 형태의 chlorophyll 유도체보다 좋은 항산화력을 보여 지방의 자동산화 저해에 porphyrin ring이 중요함을 확인하였다. Sakata et al. (1990)은 대합조개에 있어서 pheophorbide a와 연관된 물질들이 이 생물체의 항산화력에 가장 중요하다고 보고하였다. Ferruzzi, Böhm, Courtney, Schwartz (2002)는 활성라디칼 소거 및 박테리아 reverse mutagenesis 측정에 의해 수/지용성 chlorophyll 유도체가 metal chelated 유도체 만큼 *in vitro* 항산화 및 항돌연변이 활성이 있다고 하였다. 합성 metallo-chlorophyll 유도체, 특히 Cu-chelated 물질의 항산화활성은 그대로의 chlorophyll이나 항산화력이 미약한 Mg free 유도체보다 훨씬 높음이 밝혀졌다. 가장 활성이 높은 것은 Cu-substituted chlorins이었다. Sato 등 (1986)

은 rat의 liver homogenate 에서의 항산화활성을 측정함으로써 Cu-chlorin e4가 공업용 sodium Cu-chlorophyllin의 주 항산화제임을 밝혔다.

Chlorophyll은 야채류에의 높은 함량, 천연에 광범위한 존재, 식품가공과 인체섭취시의 분해 등의 이유로 해서 천연 chlorophyll 대사산물이 건강에 영향을 주는지에 대한 의문이 있어 왔다. 항산화활성과 dose dependent response에 대해 거의 자료가 없어, 본 논문에서는 6개 천연 정제된 chlorophyll 유도체(chlorophyll a, b, pheophytin a, b, pheophorbide a, b) 뿐 아니라 합성 Cu-chlorophyll의 지질산화억제작용에 대해 두가지 방법, 즉 water/linoleic acid emulsion에서의 베타카로틴 bleaching과 DPPH 소거 방법을 이용하여 규명코자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 색소 표준물질의 제조

추출과 크로마토그래피에 사용된 모든 용매(acetone, petroleum, ethanol, methanol, water)는 ACS 또는 HPLC grade(Carlo Erba, Milano, Italy)를 사용하였다. BHT나 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)와 같은 시판용 항산화제는 Sigma-Aldrich(Steinheim, Germany)에서 구입하였다. 시판용 sodium copper chlorophyllin는 CHR Hansen(Sao Paulo, Brazil)에서 구입하였다.

Chlorophyll(a,b)는 5 g의 건조된 시금치 잎에서 80% 냉각 acetone을 1:6(w/v) 비율로 해서 추출하고 진공하에서 sintered plate funnel로 여과하였다. Pellet은 잔여물이 퇴색할 때까지 추출하였다. 복합된 상등액을 함유하는 separatory funnel에 petroleum ether 60 ml과 냉각이온수 20 ml을 첨가하였다. 강한 교반과 정치 후에 물층을 제거하였다. 세척은 acetone을 제거하기 위해 3-4회 반복

하였다. 색소를 함유하는 Ether 층은 sodium sulphate anhydride로 탈수하였다. 용액은 여과하고 rotoevaporator (Heidolph Elektro GmbH & Co., WB 2000, Kelheim, Germany)로 농축하였다. 잔여물은 4-5 mL acetone에 현탁하고 0.45 µm membrane filters (PTFE- Millipore)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

시금치 추출물에 존재하는 chlorophyll(a, b)는 C₁₈ . PREP ODS (20 mm ID × 25 cm, Shimadzu, Tokyo, Japan) column을 사용하여, 분취용 HPLC (Fraction Collector Module . FRC-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분리 및 회수하였다. 분리조건은 acetone/methanol (80:20 v/v)에서 flow rate 10 mL/min로 진행하였다. Chlorophyll a와 b의 분획은 회수하여 진공 농축, 건조하였으며 정량의 acetone에 분산 후 -20°C에서 보관하였다.

Pheophytins (a, b)는 회수된 chlorophyll a, b 분획으로부터 1.0 M HCl을 넣어 제조하였다. 전환은 암소에서 약 2시간 안에 green에서 olive brown으로 색변화를 나타냄으로서 완성되었다.

Pheophorbides (a, b)는 chlorophyll에서 pheophytins을 얻는 방법과 유사하게 HCl에 의한 chlorophyllides의 acidification으로 제조되었다. Chlorophyllides (a, b)은 chlorophyll(a, b)에 endogenous chlorophyllase를 작용시켜, 5g의 건조된 시금치를 100 mL acetone/0.2 M Tris.HCl buffer (pH 8.0, 1:1 v:v)로 40°C 암소에 2시간 동안 반응시켜 제조하였다. Pheophorbides은 진술한 분취용 HPLC 시스템에서 methanol/1.0 M ammonium acetate buffer(pH 7.0)/acetone (80:10:10 v:v:v) 조건에서 분리, 회수하였다. 모든 실험은 분해 방지를 위하여 약한 빛과 차가운 용매를 사용하였다.

분취용 HPLC로 분리된 모든 색소는 진공농축하였다. Chlorophyll은 순수한 소량의 acetone과 80% acetone에 분산시키고 -20°C에서 보관하였다.

2. 분리된 색소의 확인과 정량

모든 색소는 분석용 HPLC로 확인하여 기존 문헌과 비교하고 mass spectrometry로 확인하였다.

Triple pump (LC-10ADVP) computer-controlled (Class-VP 5.032) system (Shimadzu, Tokyo, Japan CLASS-M10A)과 Nucleosil ODS 100 column (5 μ m, 250 \times 4 mm i.d., guard-column 11 \cdot 4 mm i.d., Macherey-Nagel, Düren, Germany) 을 사용하여 flow rate 1 mL/min에서 HPLC 분석을 진행하였다.

UV/Vis diode-array spectrophotometric detector (SPDM10AVP)를 사용하여 432 nm는 chlorophyll, 409 nm는 pheophytins과 pheophorbides의 최대 흡광도를 분석하였다.

Solvent system 구성은 (A) methanol/1.0 M ammonium acetate buffer (pH 7.0) (80:20 v:v), (B) methanol: acetone (80:20 v:v); (C) acetone였다. Gradient는 100% A에서 100% B로 linear하게 20 분간 진행후, isocratic 으로 2.5 분간 진행, 그리고 linear하게 7.5 분간 100% C 까지 진행하고 컬럼을 4분간 starting eluent A로 conditioning 하여 종료하였다. 시료 10.50 μ L을 주사하고 시료 당 3회 확인하였다.

정량은 표준물질의 calibration curve에 의해 계산하였다. Chlorophylls (a, b), pheophytins (a, b), pheophorbides(a, b)의 Calibration curve는 2.5 - 200 ppm (correlation coefficient = 0.99)에서 linear 하였다.

3. 베타카로틴 bleaching법에 의한 항산화 활성 측정

항산화활성 측정을 위해 water/linoleic acid

emulsion에서의 베타카로틴 bleaching 지연정도를 측정하였다. 베타카로틴은 항산화제가 없을 경우 빠른 퇴색을 보이며 free linoleic acid radical이 베타카로틴을 공격하여 이중결합을 없애지게 하여 특징적인 오렌지색이 사라진다.

정제된 색소(chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin a, pheophytin b, pheophorbide a, pheophorbide b)의 acetone 용액과 Cu-chlorophyllin의 methanol 용액을 56.7, 113.4, 226.8, 453.7, 680.6, 907.4 μ Mol/L로 준비한다. 이들은 BHT equivalent 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 ppm에 상응한다. 비교군으로서 BHT를 이용한 측정을 수행한다. 모든 측정은 3회 반복하여 평균치를 계산하였다.

Emulsion 제조로서, 10 mg의 베타카로틴(Roche)를 10 mL chloroform에 녹였다. 이 용액 1 mL을 20 mg linoleic acid와 100 mg Triton X-100이 들어있는 flask에 넣었다. 질소 존재하에서 chloroform을 제거한 후, 사전에 산소로 30 분간 oxygenation 시킨 이온수 100 mL을 잔여물에 한방울씩 떨어뜨린 후 강하게 저어 안정한 emulsion을 형성시킨다. 3 mL의 aqueous emulsion을 spectrophotometric cuvette(light path 10 mm) 내에서 0.2 mL의 각 색소 용액에 첨가하고 즉시 470nm에서 흡광도를 측정한다. Cuvettes은 암소에서 50°C water bath에 넣고 흡광도가 0이 될 때까지(약 2 시간) 매 15 분마다 흡광도를 측정하였다.

항산화활성은 control과 비교한 산화억제 %로서 나타내었으며, control의 optical density의 변화 ($D.O_{initial} - D.O_{final}$)를 100% 산화로 한다.

4. 안정한 라디칼 DPPH 소거에 의한 항산화활성 측정

이 방법은 안정한 라디칼인 DPPH를 소거하는

항산화제의 활성을 측정하는 것이다. DPPH는 H-donor와 반응할 때 상응하는 hydrazine으로 환원된다. 보다 간편하고 정확함을 위해 과일, 야채의 주스나 추출물의 항산화활성을 측정하는 것이 좋다.

3 mL의 methanolic DPPH 용액(6×10^{-5} Mol/L)을 1 mL/mol/L 농도로 고정된 각 색소 acetone 용액 75 μ L에 첨가하였다. DPPH 양의 감소는 515 nm 에서 0, 5, 30 분의 흡수도 감소로 확인하였다. 추가 시험은 Cu-chlorophyllin, Trolox 및 BHT 를 methanol에 1 mL/mol/L로 하여 진행하였다.

반응액에서의 정확한 초기 DPPH 농도(CDPPH)는 아래 식을 이용하여 $0.61 - 6.16 \times 10^{-5}$ Mol/L의 범위에서 calibration curve로 계산하였다.

$$Abs_{515\text{ nm}} = 10594 \times CDPPH - 5.2 \times 10^{-3}$$

as determined by linear regression.

항산화활성은 DPPH 라디칼의 저해 백분율(IP)로 나타내었다.

$$IP = \frac{(Abst=0\text{ min} - Abst=30\text{ min})}{(Abst=0\text{ min})} \times 100$$

항산화활성 규명에 많은 저자들이 다른 반응 시간을 사용하였으나, 본 실험에서는 Blois (1958)의 original 방법과 같이 반응시간 30분으로 정하였다. 모든 분석은 3회 측정하여 평균으로 계산하였다.

III. 결과 및 토론

본 연구의 첫 단계는, 시판되는 chlorophyll 유도체가 없기 때문에, 신선한 시금치 잎으로부터

추출된 chlorophyll a, b로부터 순수한 pheophytins, pheophorbides a 와 b를 얻는 것이었다. 순수한 chlorophyll (a, b)의 추출, pheophytin (a, b) 및 pheophorbide (a, b)는 분취용 HPLC에 의해 얻어졌고 spectral characteristics를 비교하거나 mass spectrometry에 의해 확인되었다. 천연 색소의 구조적인 특성은 Fig. 1에, spectra는 Fig. 2에 나타나 있으며, 이는 Johnson-Flanagan and Thiagarajah (1990)의 보고와 유사하였다.

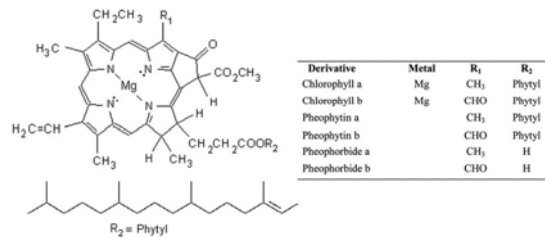


Fig. 1. Structure of chlorophyll derivatives assayed for antioxidant activity

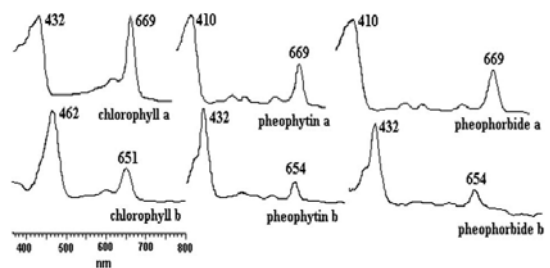


Fig. 2. Spectra and maximum absorbances (nm) of chlorophyll derivatives.

Fig. 3에 베타카로틴 bleaching법에 의한 성분들의 항산화활성이 나타나 있으며 결과는 색소가 없는 control과의 산화억제 %로 나타나 있다. 항산화활성은 넓은 범위의 농도에서 측정되었으며, 식용유의 안정성을 유지하는데 많이 쓰이고 oil-water emulsion에서 높은 항산화활성을 나타낸 BHT와 비교하였다.

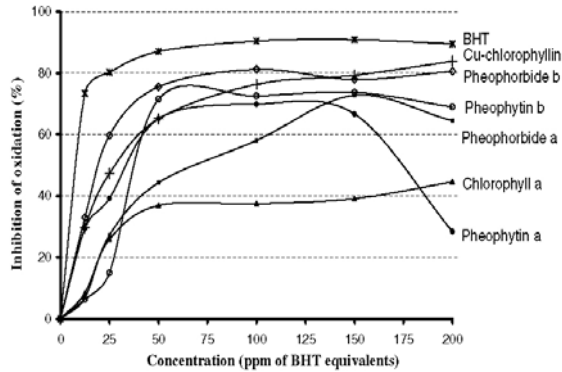


Fig. 3. Antioxidant activities of chlorophyll derivatives measured by the β -carotene bleaching method in a water/linoleic acid emulsion.

BHT는 검색한 모든 성분들중 가장 높은 항산화활성을 나타내었으며 50-200ppm에서 일정하게 90% 정도 수치를 보였다.

Pheophorbide b는 linoleic acid 산화에 가장 효과적인 억제제를 보였다. BHT equivalent 50 ppm 이상 농도에서 베타카로틴의 20% 만이 퇴색되었고, 반면 BHT에 의해서는 10%가 퇴색되었다. 퇴색이 적을수록 항산화활성이 높을 것이다. Pheophytin b 역시 비교적 높은 항산화활성을 보여, BHT equivalent 50 ppm 이상 농도에서 30%가 퇴색되었으며 이는 pheophorbide b도 유사하였다. BHT에 버금가는 항산화활성을 보였으나 두 물질은 상이한 용해도를 나타내었다. Pheophytins이 lipophilic한 반면, pheophorbides에서 phytol의 부재는 이 물질을 hydrophilic 하게 하여, 상이한 항산화활성이 예상된다. 지방 산화가, lipophilic 항산화물질이 존재하는 water/oil 계면에서 일어난다는 “polar paradox”에 따르면 더 많은 hydrophilic pheophorbide가 pheophytin에서보다 더 낮은 항산화활성을 나타냈어야 했을 것이다. 본 연구에서는, 2 phase emulsion에서의 분포와 관련된 상이한 용해도 특성은 두 물질의 효능에 영향을 주지는 않는 것 같았다.

Pheophorbide a는 12.5 ppm에서 서서히 시작하여 150 ppm에서 최대의 활성을 보였으나 Pheophorbide b보다 낮은 약한 활성을 나타내었다.

녹색 야채에 가장 많은 색소인 chlorophyll a는 모든 농도에서 전체 녹색 색소중 가장 낮은 항산화활성을 나타내었다. BHT equivalent 200 ppm 이상에서 서서히 활성이 증가되어 44%의 항산화활성을 나타내었으며, 이 때 BHT는 90%의 활성을 나타냈다. Chlorophyll a의 낮은 항산화활성은 화학적 불안정성이 높기 때문인 것으로 설명될 수 있다. Usuki et al. (1984)에 의하면 불포화 지방산을 함유하는 반응액은 chlorophyll의 분해를 촉진하여 항산화력을 떨어뜨린다고 한다. Chlorophyll a와 달리 metal-free 부위인 pheophytin a는 BHT equivalent 50-100 ppm에서 70% 정도의 비교적 높은 산화억제를 나타내었으며 높은 농도에서는 급격히 감소하였다. 이러한 dose-response 의존성은 다른 연구자들에게서도 관찰되었다. 대부분의 경우에 항산화활성은 항산화제의 농도가 어떤 수위에 달할 때까지는 증가하나 더 높은 농도에서는 pro-oxidant로서 작용한다.

Chlorophyll a에 대조적으로 sodium copper chlorophyllin은 pheophorbide b와 같은 정도의 높은 항산화활성을 나타내었다.

베타카로틴 bleaching법은 chlorophyll b의 항산화활성을 측정하는 데에 적합하지 않다. 이 색소는 acetone 용액내에서 462 nm에서 강하게 흡수되어 447, 474 nm에서 흡수되는 베타카로틴과 background interference를 유발한다.

일반적으로 유도체 b는 유도체 a 보다 높은 항산화력을 나타내었다. 이것은, 아직 더 밝혀야 할 기작이지만, methyl기 대신에 aldehyde기의 존재가 더 좋은 항산화력을 제공한다는 가설을 설명한다.

베타카로틴 bleaching 법과 기존의 chain breaking based 방법의 결과를 비교하기 위해 DPPH 라디

칼 소거 측정법을 BHT equivalents 200 ppm에 해당하는 농도인 1 mMol/L 농도에서 모든 색소에서 확인하였다. Trolox와 BHT가 DPPH의 80%와 43%를 소거하는데 반해, 모든 천연 색소들은 12% 이하의 낮은 소거활성을 나타내었다. 반면 Cu-chlorophyllin은 중간 정도인 39%의 소거로서 BHT와 비교할 정도가 되었다. 이는 라디칼 소거와 bacterial reverse mutagenesis 측정법에 의해 chlorophyll 유도체의 *in vitro* 항산화 및 항돌연변이 활성을 측정한 Ferruzzi et al. (2002)의 결과와 같았다. 저자에 따르면 Zn, Cu의 synthetic metallo-complexes 또는 시판 sodium copper chlorophyllins는 천연 chlorophyll 유도체보다 훨씬 높은 항산화활성을 나타내며, chelated metal의 상태가 conjugated porphyrin system으로부터 전자공여능을 변화시킨다 하였다.

다른 연구자들로부터는 chlorophyll 유도체의 항산화활성에 대한 상이한 결과가 얻어졌다. Endo et al. (1985a)는 암소에서 oil의 자동산화에 대한 chlorophylls과 pheophytins의 영향을 연구하여 4종 색소에 대해 2-200 ppm의 농도를 시험하였다. 가장 강한 활성은 chlorophyll a 였으며, BHT, chlorophyll b, pheophytin a, pheophytin b의 순서였고 4종 색소는 linear dose-dependent response를 나타내었다.

이러한 결과의 차이는 항산화활성 측정방법의 차이에 기인한 것으로 보인다. Becker et al. (2004)에 의하면, 동일 물질에 대한 항산화활성의 상반된 결과를 나타내는 몇가지 요소로서 시험시스템의 물리적 구조, 산화를 위한 기질의 상태, 사용한 분석방법을 논하였다. 인용된 저자의 경우 lipophylic system의 peroxide development를 사용한 반면, 본 실험에서는 aqueous emulsion에서의 베타카로틴 bleaching 법을 사용하였다. 이런 결과들에 의하면, 한가지 방법으로 항산화효과를 설명할 수 없고 그 이상의 방법이 시행되어야 할 것으로 보

인다.

매일의 chlorophyll의 섭취를 고려하면 항산화제로서의 천연 chlorophyll에 대한 연구가 더 진행되어야 한다.

IV. 결론

측정된 색소중 pheophorbide와 pheophytin b가 베타카로틴 bleaching 법으로 실험시 BHT와 비견할 정도로 가장 강력한 항산화활성을 보였다. 그러나 잠재적인 항산화 기능에도 불구하고 이 색소들은 녹색 야채의 minor한 구성성분이며 전체적인 지질산화 억제에 크게 영향을 주지 않는다. Chlorophyll a는 1 mMol/L 정도의 고농도에서만 확실한 항산화활성을 나타내나, 식물체내에 다량 존재하기 때문에 지질산화에 중요한 역할을 할 것이다. 모든 천연 chlorophyll 유도체는 DPPH assay에 의한 결과로 볼 때 Trolox에 비해 낮은 항산화활성을 나타냈다. 연관된 작용기작은 hydrogen donation 기능과 연관 있는 것이 아니라 linoleic acid 산화 억제 및 hydroperoxide의 분해저해와 연관된 듯하다. 적용한 두가지 방법에서 Cu-chlorophyllin은 모든 천연 chlorophyll 보다 높은 항산화활성을 나타내었으며 chelated metal의 중요성을 보여주었다. 이들 물질의 항산화활성 기작을 규명하기 위해서는 상이한 시험방법에 기초한 더 많은 연구가 이루어져야 한다. 최소한 chlorophyll 유도체중 어떤 것의 강력한 항산화활성은 식이조절에 의한 건강증진에 중요한 의미를 가진 것으로 보이며 향후 더욱 연구될 가치가 있다.

V. 참고문헌

1. Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523 - 24, 9 - 20.

2. Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *European Food Research Technology*, 219, 561 - 571.
3. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181(26), 1199 - 1200.
4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25 - 30.
5. Breemen, R. B., Canjura, F. L., & Schwartz, S. J. (1991). Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1452 - 1456.
6. Endo, Y., Usuki, R., & Kaneda, T. (1985a). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62(9), 1375 - 1378.
7. Endo, Y., Usuki, R., & Kaneda, T. (1985b). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62(9), 1387 - 1390.
8. Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., & Schwartz, S. J. (2002). Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of Food Science*, 67(7), 2589 - 2595.
9. Hörtensteiner, S., Vicentini, F., & Matile, P. (1995). Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: enzymatic cleavage of pheophorbide a in vitro. *New Phytology*, 129, 237 - 246.
10. Hoshina, C., Tomita, K., & Shioi, Y. (1998). Antioxidant activity of chlorophylls: its structure - ctivity relationship. *Photosynthesis: Mechanisms Effects*, 4, 3281 - 3284.
11. Johnson-Flanagan, A. M., & Thiagarajah, M. R. (1990). Degreening in canola (*Brassica napus*, c.v. Westar) embryos under optimum conditions. *Journal of Plant Physiology*, 136, 180 - 186.
12. Koleva, I. I., Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, 13(1), 8 - 17.
13. Mangos, T. J., & Berger, R. G. (1997). Determination of major chlorophyll degradation products. *Lebensmittel Unters Forsch A*, 204, 345 - 350.
14. Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45, 594 - 598.
15. Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45, 91.
16. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145 - 171.
17. Prybylski, R., Lee, Y. C., & Eskin, N. A. M. (1998). Antioxidant and radical-scavenging

- activities of buckwheat seed components. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 1595 - 1601.
18. Sakata, K., Yamamoto, K., Ishikawa, H., Yagi, A., Etoh, H., & Ina, K. (1990). Chlorophyllone-A, a new pheophorbide - a related compound isolated from *Ruditapes philippinarum* as an antioxidant compound. *Tetrahedron Letters*, 31(8), 1165 - 1168.
 19. Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121 - 137.
 20. Sato, M., Fujimoto, I., Sakai, T., Aimoto, T., Kimura, R., & Murata, T. (1986). Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(6), 2428 - 2434.
 21. Schwartz, S. J., Woo, S. L., & Von-Elbe, H. J. (1981). High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 533 - 535.
 22. Sinnecker, P., Braga, N., Macchione, E. L. A., & Lanfer-Marquez, U. M. (2005). Mechanism of soybean (*Glycine max* L. Merrill) degreening related to maturity stage and postharvest temperature of drying. *Postharvest Biology and Technology* (accepted).
 23. Usuki, R., Endo, Y., & Kaneda, T. (1984b). Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. *Journal of Biological Chemistry*, 48(4), 991 - 994.
 24. Usuki, R., Suzuki, T., Endo, Y., & Kaneda, T. K. (1984). Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(4), 785 - 788.
 25. Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335 - 342.
- <출처 : *Food Research International*, 38, 885-891, 2005>

