

제주도 자생 차나무과 식물의 ACE, APN, α -amylase 저해 활성 및 항산화활성에 대한 연구

오순자, 이진호¹, 고광섭¹, 신동범², 고석찬*

제주대학교 생물학과·기초과학연구소, ¹(주)장원 설록차연구소, ²제주대학교 식품영양학과

Antioxidative activity, including Inhibitory activities of ACE, APN and α -amylase, in Theaceae Plants Native to Jeju Island

Soonja Oh, Jin-ho Lee¹, Kwang-Sup Ko¹, Dong-Bum Shin², and Seok Chan Koh*

Department of Biology & Research Institute for Basic Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea
¹Sulloc Cha Institute of Jangwon Co. Ltd., Jeju 697-922, Korea

²Department of Food Science & Nutrition, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - Antioxidative activity, including inhibitory activities of angiotensin I converting enzyme(ACE), aminopeptidase N(APN) and α -amylase, was investigated in the methanol extracts from Theaceae plants native to Jeju island, in order to select the plant species containing bioactive materials for functional food or medicines. ACE inhibitory activity was above 50% in *Ternstroemia japonica*(stem bark) and *Cleyera japonica*(leaf), and APN inhibitory activity was low to be positive only in *C. japonica*(leaf, stem bark) and *T. japonica*(stem bark). α -Amylase inhibitory activity was above 30% in *Camellia japonica*(fruit), *Eurya emarginata*(stem), *T. japonica*(stem bark) and *Thea sinensis*(stem). The antioxidative activity, estimated by the DPPH radical scavenging capacity, was above 30% in *C. japonica*(stem bark), *T. japonica*(stem bark) and *T. sinensis*(leaf). Particularly, the antioxidative activity analyzed by dot-blot test was very high in *C. japonica*(stem bark) relatively to those of other plants, and remained high in the low concentration(1.25 μ g/ml). From the TLC analysis of antioxidative compounds, EGC(Rf 0.26) was found to have high activity in stem bark of *C. japonica* and EGCG(Rf 0.09) was found to have high activity in stem bark of *C. japonica*, *E. emarginata*, and *T. japonica*. Five bands (Rf 0.54, 0.46, 0.44, 0.16, 0.03) which were not identified as compared with catechins were detected as polyphenolic compounds on the TLC plates sprayed with the Folin-Ciocalteu solution or the Ferric chloride-alcohol solution. These results suggests that Theaceae plants except *E. japonica* could be potentially used as a resource of bioactive materials for functional foods or medicines and further research is required to identify the bioactive substances and determine the functions of them.

Key words - Theaceae plants, inhibitory activity, angiotensin I converting enzyme(ACE), aminopeptidase N(APN), α -amylase, antioxidative activity, bioactive materials

서 언

차나무과 식물은 전 세계적으로 40속 600종이 열대, 아열대, 온대지방에 분포하며, 우리나라에서는 6속 7종이 자라고 있고 제주도에는 5속 6종이 분포하고 있다. 일반적으로 차나무는 충치예방, 입 냄새 제거, 혈압상승억제, 혈중 콜레스테롤 상승억제 등의 효과가 있으며, 항암작용에 대

한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 차나무와 동일한 속에 해당하는 동백나무에서도 항미생물과 항산화 효과가 보고되었고(Lee *et al.*, 2005), 우묵사스레피나무, 후피향나무 등은 민간에서 약재로 사용되고 있으며, 최근에는 성분분석 및 활용화에 대한 연구가 이루어지고 있다(You, 2008; Shin, 2001).

경제성장과 생활수준의 향상으로 고혈압, 암, 당뇨, 비만과 같은 다양한 성인병의 발병이 지속적으로 증가하고 있다. 고혈압은 모든 순환기계 질병의 원인이 되는 대표적

*교신저자(E-mail) : sckoh@jejunu.ac.kr

성인병으로 그 원인은 주로 혈압조절 및 전해질 균형의 조절에 중요한 역할을 하는 renin-angiotensin-aldosterone system으로 설명되며, 여기에는 angiotensin I converting enzyme (ACE)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, ACE의 작용에 의해 angiotensin I 으로부터 생성된 angiotensin II는 직접 동맥 및 소동맥을 수축시키는 작용과 부신피질을 흥분시켜 aldosterone의 유리를 촉진시킴으로써 결국 혈압을 올리는 작용을 한다(Sealey and Laragh, 1990). 또한, ACE는 혈압강하 작용을 하는 bradkinin을 불활성화시킨다. 따라서 고혈압의 억제에는 ACE의 작용을 억제함으로써 가능하며, 대부분의 고혈압 치료약이 ACE 활성 저해제로 알려져 있다(Ondetti *et al.*, 1977). 암은 활성산소를 비롯하여 스트레스, 공해, 화학약품 등 여러 가지 요인들에 의해 유발되며, 전 세계적으로 인간의 건강과 생명을 위협하는 두드러진 질병 중의 하나이다. Aminopeptidase N(APN)은 세포막에 결합하고 있는 단백질 분해효소의 일종이며, 혈관신생에서 세포 표면에 존재하여 혈관과 암 조직 사이에 있는 세포간극 조직단백질을 분해하여 새로운 혈관이 암세포에 다다르는데 도움을 주거나, 혹은 혈관신생을 촉진하거나 억제하는 단백질성 인자의 활성화 또는 억제에 관여한다고 알려지고 있다(Gros *et al.*, 1985). 하지만 아직까지 APN을 선택적으로 저해하는 약물의 개발은 많이 이루어지지 않았다. 당뇨병은 혈당조절이 원활히 이루어지지 않아 발생하는 것으로 여러 가지 요인으로 당뇨병의 환자수가 빠른 속도로 증가하고 있을 뿐만 아니라 그 발병 연령이 점차 낮아지고 있어 그 심각성이 매우 크다. 기존의 혈당강하제의 문제점인 저혈당과 같은 부작용을 피하면서 식후 고혈당을 효과적으로 조절할 수 있는 방법으로 소장에서의 당 흡수를 저해하는 아이디어가 제시되고 있다(Puls and Keup, 1973). 소장에서 음식물 중의 전분은 α -amylase와 α -glucosidase에 의해 포도당으로 분해되어 흡수된다. 따라서 소장의 α -amylase와 α -glucosidase를 저해함으로써 포도당의 흡수를 지연시켜 당뇨병 환자의 식후 고혈당을 예방할 수 있다(Toeller, 1994). 이러한 목적으로 곡류나 두류 등의 식품이나 한약재와 미생물을 대상으로 연구가 이루어지고 있다(Shim *et al.*, 1994).

한편, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 안정한 분자상태인 기저삼중항산소(ground state triplet oxygen; 3O_2)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등

에 의하여 환원되어 생성되며, superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical($\cdot OH$), 과산화수소 (hydrogen peroxide; H_2O_2), 일중항산소(singlet oxygen; 1O_2) 등이 있다(Fridovich, 1978; Alscher and Hess, 1993). 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막 분해, 지질 산화, 단백질 분해, DNA합성 저해, 노화촉진 등 심각한 생리적 장애를 일으키며, 심한 경우 세포사멸을 초래한다(Alscher and Hess, 1993; Lester and Alexander, 1993). 활성산소종을 조절하거나 제거할 수 있는 물질로서는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalase 등의 항산화효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, β -carotene, glutathione 등의 천연 항산화제 또는 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), Troxol-C 등의 합성 항산화제가 알려져 있다(Alscher and Hess, 1993; Inze and Van Montagu, 1995). 그 중 BHA와 BHT 등의 페놀계 합성 항산화제가 의약품 및 식품 분야 등에서 많이 사용되어 왔지만 합성 식품첨가물의 기피현상과 과량 섭취시 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 일으키고, 암을 유발하는 등 안정성에 있어서 문제가 제기되고 있다(Branen, 1975; Choe and Yang, 1982). 따라서 합성 항산화제의 문제점을 보완할 수 있는 천연 항산화제를 국내에 자생하고 있는 식물자원으로부터 개발할 필요가 있다.

본 연구는 식물자원으로부터 새로운 기능성 소재를 함유하는 식물자원을 선별하여 활용하고자 시도되었으며, 제주도에 자라는 차나무과 식물을 대상으로 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, aminopeptidase N (APN) 저해활성, α -amylase 저해활성을 살펴보았다. 그리고 항산화활성을 검색하고 TLC를 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

재료

제주도에 자생하는 동백나무(*Camellia japonica*), 비쭈기나무(*Cleyera japonica*), 사스레피나무(*Eurya japonica*), 우묵사스레피나무(*Eurya emarginata*), 후피향나무(*Ternstroemia japonica*), 차나무(*Thea sinensis*) 등 차나무과 식물 6종 13점을 선정하였으며(Lee, 1996), 「한국식물추출물은행」으로부터 분양받아 사용하였다. 추출물의 제조과정을 보면, 우선 분쇄된 분말시료 30~40 g에 메탄올 200 ml를 첨가하여 고압용매추출장치(Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA)

를 사용하여 50°C, 1500 psi하에서 20분간 추출하였다. 추출물은 회전진공증발농축기(Modul spin 40, Biotron Co., Korea)로 감압 농축하여 동결건조한 후 4°C하에서 보관하였다. 분양받은 시료는 최종농도가 0.01 mg/ml가 되도록 메탄올로 조제하여 본 실험에 사용하였다.

분석시약

시험분석을 위한 시약으로 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), L-ascorbic acid, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), (+)-catechin(C), (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(ECG), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), rabbit lung acetone powder, N-(3-(2-furyl)acryloyl)-Phe-Gly-Gly(FAPGG), porcine kidney leucine aminopeptidase, L-leucine-p-nitroanilide, porcine pancreatin α-amylase, starch는 Sigma Co. 제품을 사용하였다. 그리고, 전처리 과정에 사용된 메탄올은 Merck Co. 제품의 특급 시약을 사용하였다.

ACE, APN 및 α-Amylase 저해활성의 측정

ACE 저해활성은 Bala *et al.* (2002)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉, microplate에 시료 20 µl와 기질용액 [0.5 mM FAPGG, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl] 150 µl를 가한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다. 이어서 0.1 unit/ml ACE 효소용액(rabbit lung acetone powder) 20 µl를 첨가하여 37°C에서 120분간 반응시킨 후 microplate reader에서 340nm의 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 나타내었다.

APN 저해활성은 Chung *et al.* (1996)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉, 사용직전에 L-leucine-p-nitroanilide stock solution(12.5 mg/ml in DMSO) 100 µl를 0.1M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0) 10 ml에 희석하여 160 µl 씩 microplate well에 넣은 후, 시료용액 20 µl를 넣는다. 이어서 0.1 unit/ml leucine aminopeptidase 20 µl를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 405nm에서 흡광도를 측정하여 APN 저해활성을 나타내었다.

α-Amylase 저해활성은 Satoyama *et al.* (1998)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 즉, 2% starch 용액(0.1M citric acid; pH 6.0)과 3.2% 한천용액(0.1M citric acid; pH 6.0)을 60°C 항온수조에서 동량 혼합한 후, microplate

의 각 well에 100 µl씩 분주하고 냉각시켜 기질 plate를 만들고, 37°C에서 10분간 인큐베이션시켰다. 이어서 microplate의 각 well에 10 unit/ml α-amylase 25 µl와 시료 25 µl을 각각 첨가하고 37°C에서 120분간 반응시킨 후, 655nm에서 흡광도를 측정하여 α-Amylase 저해활성을 나타내었다.

ACE, APN, α-Amylase 저해활성은 다음의 식에 의해 나타내었으며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균치로 나타내었다.

$$\text{저해활성(\%)} = [1 - (A_i - A_f) / (B_i - B_f)] \times 100$$

A_i, A_f, 반응 전후의 반응용액의 흡광도; B_i, B_f, 반응 전후의 공시험의 흡광도

항산화활성 측정

항산화활성은 DPPH radical에 대한 전자공여능(electron donating ability; EDA)을 측정하였으며 Blois(1958)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, microplate에 50% 메탄올 용액 140 µl, 시료용액 20 µl, 1.0 mM DPPH 용액 40 µl를 차례로 넣고 균일하게 혼합한 다음 암상태의 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 자체의 발색으로 인한 측정 오차를 줄이기 위하여 시료자체의 흡광도를 측정하여 보정하였다. 대조시험으로는 일상생활에서 차로 음용하며 항산화물질이 다량 함유하고 있는 것으로 확인된 차나무 잎 추출물과 그리고 상용 항산화제인 L-ascorbic acid, BHA, BHT를 0.01 mg/ml로 조제하여 사용하였다. 전자공여능은 시료 첨가구(A)와 무첨가구(B)의 흡광도를 이용하여 아래 수식에 따라 산출하였고, 반응용액 1 ml 당 시료 건량 0.01 mg의 전자공여능으로 나타내었으며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균치로 나타내었다.

$$\text{EDA(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A, 518nm에서 시료의 흡광도; B, 518nm에서 공시험의 흡광도

Dot-blot test에 의한 항산화활성은 silica gel-coated TLC plate(Silica gel 60 F254, Merck)를 사용하여 검정하였다. 즉, 각각의 시료를 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 µg/ml의 농도로 조제하여 2 µl씩 spot을 찍은 후 잘 건조시킨 뒤, DPPH 용액을 분사하여 그 활성을

검정하였다. 즉, silica gel 층의 DPPH 보라색이 환원되며 노란색/흰색의 시료점적 위치가 보이게 되므로, 이것을 항산화활성으로 판단하였다.

박층크로마토그래피에 의한 항산화물질 분석

항산화활성 성분은 박층크로마토그래피(thin layer chromatography)로 검출하였다. 전개용매는 toluene, ethyl acetate, formic acid(5:4:1, v/v/v)를 사용하였으며, 전개가 끝난 후 TLC plate를 꺼내어 건조시키고 1.0 mM DPPH 용액을 분사하여 DPPH scavenging activity 분석을 관찰하였다. 즉, TLC plate에 전개된 각 성분의 밴드 주위의 DPPH 시약이 자색이 탈색되어 흰색으로 변하는 것을 항산화 양성으로 판정하였다. 이때 표준물질로는 (+)-catechin (C), (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(EGC), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)을 사용하여 Rf값을 비교하여 동정하였다.

폐놀성 물질은 항산화활성 성분과 같은 방법으로 박층크로마토그래피로 전개하여 분리하였다. 전개가 끝난 후에는 TLC plate를 꺼내어 건조시키고, Folin-Ciocalteu reagent와 Ferric chloride-alcohol를 발색제로 사용하여 폐놀화합물의 유형을 확인하였다.

결과 및 고찰

ACE, APN 및 α -Amylase 저해활성

ACE 저해활성은 혈압상승 억제제의 지표가 되는 활성이다. ACE 저해제는 ACE 활성을 저해함으로써 angiotensin II의 생성저해, 알도스테론의 분비감소, 혈관확장제인 bradkinin의 증가 등의 작용을 통해 신장혈관을 확장시켜 나트륨의 배설을 촉진시킴으로써 혈압을 낮추어줄 수 있으며, 이로 인해 심장질환 및 뇌혈관질환 등 고혈압과 관련이 깊은 질환을 치료하는데 사용될 수 있다(Oh *et al.*, 1997). 제주도에 자생하는 차나무과 식물을 대상으로 ACE 저해활성을 살펴본 결과, 후피향나무의 수피와 비쭈기나무의 잎에서 50% 이상의 높은 저해활성을 보였다(Table 1). 시판되고 있는 ACE 저해제로서 화학합성제인 enalapril과 captopril 등이 개발되어 이용되고 있으나, 이들 성분들은 화학합성제로서 헛기침, 미각장애, 피부홍진, 혈관부종, 급성신부전 등 여러 가지 신체 부작용이나 독성 등이 나타날 수 있으므로 천연물 유래의 고혈압 개선제의 개발이 절실히 요구된다(Hong *et al.*, 2006). 따라서 안정성 측면에서 천연물질에 대한 탐색과 개발이 필요하며, 본 연구 결과 높은 ACE 저해활성을 보이는 후피향나무와 비쭈기나무 등을 중심으로 성분분석과 분리·정제과정 등의 추후실험이 필요할 것으로 보인다.

Table 1. Inhibitory activities of ACE, APN, and α -amylase in methanol extracts from Theaceae plants native to Jeju Island

Scientific name	Korean name	Used parts	Inhibitory activity (%)		
			ACE	APN	α -Amylase
<i>Camellia japonica</i>	동백나무	fruit	11.8 ± 3.9	-40.7 ± 1.1	36.3 ± 2.1
		leaf	25.1 ± 5.5	-27.6 ± 2.1	15.5 ± 6.1
		stem	8.7 ± 3.1	-17.4 ± 2.8	26.6 ± 0.8
<i>Cleyera japonica</i>	비쭈기나무	leaf	52.7 ± 4.2	26.7 ± 2.1	22.1 ± 1.2
		stem bark	1.0 ± 14.6	43.1 ± 2.5	22.8 ± 1.6
<i>Eurya emarginata</i>	우묵사스레피나무	leaf	-2.3 ± 3.6	-27.7 ± 2.3	17.8 ± 3.1
		stem	18.7 ± 3.8	-3.2 ± 3.8	34.9 ± 3.2
<i>Eurya japonica</i>	사스레피나무	leaf	2.3 ± 4.0	-32.5 ± 0.4	18.0 ± 2.0
		stem bark	7.4 ± 15.0	-35.0 ± 2.2	14.4 ± 3.1
<i>Ternstroemia japonica</i>	후피향나무	leaf	14.3 ± 2.5	-48.2 ± 7.0	16.8 ± 9.5
		stem bark	64.8 ± 6.0	12.3 ± 3.7	30.9 ± 2.8
<i>Thea sinensis</i>	차나무	leaf	4.3 ± 8.3	-28.8 ± 4.9	20.6 ± 4.0
		stem	0.7 ± 1.4	-32.0 ± 1.5	32.0 ± 6.2

APN은 세포막에 결합하고 있는 단백질 분해효소의 일종으로 peptide의 N-말단 아미노산을 제거하는 활성을 갖고 있으며, 활성부위에 Zn을 갖는 metalloenzyme이다. 이 효소는 혈관신생에서 세포 표면에 존재하며 혈관과 암 조직 사이에 있는 세포간극 조직단백질을 분해하여 새로운 혈관이 암세포에 다다르는데 도움을 주거나, 혹은 혈관신생을 촉진하거나 억제하는 단백질성 인자의 활성화나 억제에 관여한다고 알려지고 있다(Gros *et al.*, 1985). 본 연구에서 차나무과 식물에 관한 연구 결과, 비쭈기나무(잎, 수피)와 후피향나무(수피)에서만 양의 활성을 보였다(Table 1). 그 중에서 비쭈기나무의 수피는 43.1%로 비교적 높은 APN 저해활성을 보였다. 현재까지 알려진 APN 저해제로는 미생물로부터 분리한 amastatin, bestatin, actinonin 등이 있으며, 암세포의 성장이나 전이를 억제하는 것으로 보고되었다(Bauvois and Dauzonne, 2006). 하지만 아직까지 천연물로부터 APN을 선택적으로 저해하는 약물 개발은 그다지 많이 되지 않았다. 따라서 APN 저해활성을 보이는 비쭈기나무와 후피향나무에 대하여 심도있는 연구가 필요하다고 할 수 있다.

α -Amylase 저해활성은 혈당수치 상승억제의 지표가 되는 활성이다. 현대사회에 있어서 여러 가지 요인으로 당뇨병의 환자수가 빠른 속도로 증가하고 있을 뿐만 아니라 그 발병 연령이 점차 낮아지고 있어 그 심각성이 매우 크다. 기존의 혈당강하제의 문제점인 저혈당과 같은 부작용을 피하면서 식후 고혈당을 효과적으로 조절할 수 있는 방법으로 소장에서의 당 흡수를 저해하는 아이디어가 제시된 바 있다(Puls and Keup, 1973). 소장에서 음식물 중의 전분은 α -amylase와 α -glucosidase에 의해 포도당과 같은 단당류로 분해되어 흡수된다. 따라서 소장의 α -amylase와 α -glucosidase를 저해함으로써 포도당의 흡수를 지연시켜 당뇨병 환자의 식후 고혈당을 예방할 수 있다 (Toeller, 1994). 본 연구에서 α -amylase 저해활성을 분석한 결과, 동백나무(열매), 우묵사스레피나무(줄기), 후피향나무(수피), 차나무(줄기)에서 30% 이상의 저해활성을 보였다(Table 1). 현재까지 수종의 α -amylase와 α -glucosidase 저해제가 의약품으로 개발되어 사용되고 있으나, 이들 약물은 혈당상승 억제효과는 강하지만 지속적인 복용 시 설사와 복통 등의 부작용을 동반하는 것으로 보고되었다(Rhinehart *et al.*, 1987). 따라서 안정성 측면에서 가치가 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발이 필요하며, 그러한 측면에서 α -amylase 저해활성

을 보이는 동백나무, 우묵사스레피나무, 후피향나무, 차나무 등의 천연식물에 대한 관심이 필요하다고 할 수 있다.

이와 같이 후피향나무, 비쭈기나무, 동백나무, 우묵사스레피나무 등의 차나무과 식물들은 다양한 생리활성을 보유하고 있는 것으로 사료되지만, 기호식품으로 사용되고 있는 차나무와는 대조적으로 주로 관상식물로 국한되어 이용되고 있을 뿐 유용한 자원으로 산업화되고 있지 못하고 있다. 본 연구에서 ACE 저해활성과 α -amylase 저해활성이 높은 것으로 나타난 후피향나무(*Ternstroemia japonica*)는 열매에 들어있는 saponin이 항산화활성을 갖는 것으로 보고된 바 있다(Shin, 2001). 그리고 ACE 저해활성과 APN 저해활성이 높은 비쭈기나무(*Cleyera japonica*)도 열매에 높은 항산화활성이 있으며(Oh and Koh, 2002), 같은 속 식물로서 타이완에 자생하는 *Cleyera japonica* var. *morii*에서도 높은 항산화활성을 갖는 것으로 보고된 바 있다(Hou *et al.*, 2003). α -Amylase 저해활성이 높은 동백나무(*Camellia japonica*)는 차나무가 없는 지역에서는 예로부터 어린잎을 차의 재료로 사용하였다는 기록이 있다(Hwang *et al.*, 2004). 우묵사스레피나무(*Eurya emarginata*)는 민간에서 잎을 이뇨와 담 제거 등의 약재로 사용하였으며, 잎에서 분리한 eutigoside B와 C에서 항암, 항산화 및 항염증 효과를 갖는 것으로 보고된 바 있다(Park *et al.*, 2005). 본 차나무과 식물을 대상으로 한 생리활성 분석을 통하여 고기능성 소재에 대한 연구개발의 가능성을 확인할 수 있었다. 더군다나 이들 차나무과 식물들은 민간에서 약재로 사용되었으며(You, 2008; Shin, 2001; Hwang *et al.*, 2004), 동백나무의 경우는 어린잎과 꽃 등을 식용하였다는 기록이 있어 차나무 대용의 새로운 식물자원으로 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

항산화 활성

생체 내 산화과정에서 생기는 활성산소와 자유라디칼은 세포노화, 고혈압, 당뇨 및 암 등의 질병의 주된 요인 중의 하나로 알려져 있다. 따라서 체내에서 일어날 수 있는 산화 과정을 억제하고 예방하는 것은 상기한 질병의 발생을 예방하거나, 정도를 완화시키는 일차적인 방법이 될 수 있다. 항산화제는 산화과정에서 생기는 활성산소인 일중항산소를 직접 제거하거나 유리 지방산의 자동 산화반응에서 생기는 자유라디칼의 생성을 억제하여 산화를 방지한다. 특정물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있

Table 2. Antioxidative activity of methanol extracts from Theaceae plants native to Jeju Island

Scientific name	Korean name	Used parts	Antioxidative activity (%)
<i>Camellia japonica</i>	동백나무	fruit	-
		leaf	14.2 ± 4.5
		stem	9.9 ± 4.0
<i>Cleyera japonica</i>	비쭈기나무	leaf	24.5 ± 3.5
		stem bark	30.9 ± 1.4
<i>Eurya emarginata</i>	우묵사스레피나무	leaf	3.2 ± 2.4
		stem	14.5 ± 6.0
<i>Eurya japonica</i>	사스레피나무	leaf	1.1 ± 1.6
		stem bark	22.0 ± 4.1
<i>Ternstroemia japonica</i>	후피향나무	leaf	4.5 ± 5.8
		stem bark	35.5 ± 2.8
<i>Thea sinensis</i>	차나무	leaf	30.9 ± 2.8
		stem	0.7 ± 1.0
		L-ascorbic acid	53.6 ± 0.7
Butylated hydroxytoluene (BHT)			38.9 ± 0.6
Butylated hydroxyanisole (BHA)			61.7 ± 0.6

으나 그 중에서도 DPPH법을 이용한 전자공여능 측정법은 항산화활성을 간단히 측정할 수 있으며 실제 항산화활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되는 방법이다.

제주도에 자라는 차나무과 식물을 대상으로 메탄올 추출물의 항산화활성을 분석한 결과, 비쭈기나무(수피), 후피향나무(수피), 차나무(잎)에서 30% 이상의 비교적 높은 전자공여능을 나타내었다(Table 2). 특히, 후피향나무 수피의 항산화활성은 본 실험에 동일 농도의 대조구로 사용된 BHA (61.7%)와 ascorbic acid(53.6%) 보다는 낮았지만, BHT (38.9%)와 유사한 활성을 보였다. 그리고, dot-blot test에 의한 차나무과 식물의 농도별로 점적한 spot의 활성 강도를 보면 비쭈기나무(수피)는 다른 종에 비해 활성이 높아 1.25 μ g/ml의 낮은 농도에서도 높은 항산화활성을 보였으며(Fig. 1), 이는 대조구로 사용된 1.25 μ g/ml의 ascorbic acid, BHA 보다도 높고, BHT와 유사하였다. 우묵사스레피나무(수피)와 후피향나무(수피)도 2.5 μ g/ml의 농도에서 높은 항산화활성을 보여 대조구로 사용된 2.5 μ g/ml의 BHT보다는 낮지만 ascorbic acid, BHA 보다 높은 활성강도를 보였다. 따라서 비쭈기나무(수피), 우묵사스레피나무(수피), 후피향나무(수피)의 추출물인 경우는 저농도에서는 ascorbic acid나 BHA에 비해 오히려 높은 항산화활성을 가지고 있는 것으로 사료된다. 그리고, 동백나무(잎), 비쭈기나무(잎), 사스레피나무(잎), 차나무(잎)은 5 μ g/ml의 농도에서 활성을 보여 5 μ g/ml의 ascorbic

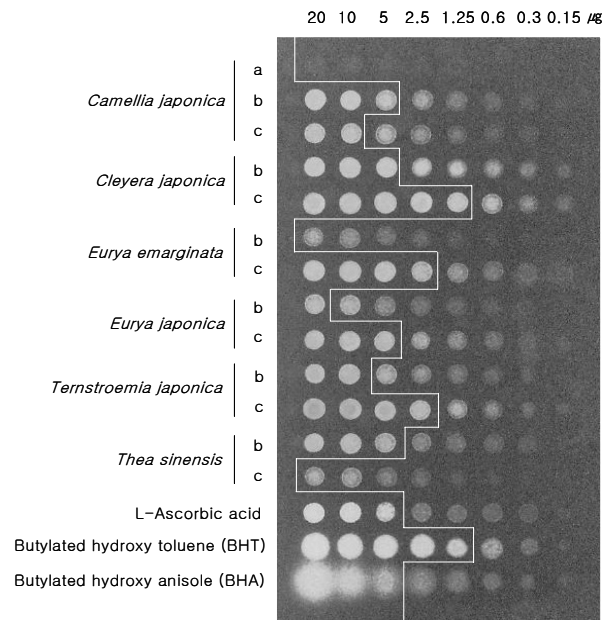


Fig. 1. Dot-blot assay of radical scavenging capacity(RSC) on the silica sheet stained with DPPH solution. 2 μ l dilutions of plant extracts, ascorbic acid, BHT, and BHA were applied from left to right: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 μ g/ml. a, seed; b, leaves; c, stem or stem bark. The white line indicates the concentration in each sample which shows the same antioxidative activity in the dot-blot assay.

acid나 BHA와 유사한 양상을 나타내었다.

박층크로마토그래피에 의한 항산화물질의 분석

차나무 잎에는 건체량의 30%에 해당하는 많은 양의 polyphenol을 함유하고 있는데, 대부분은 flavonoid류이며, 특히 flavanol에 해당하는 catechin류가 대부분이며, 이들은 강한 항산화력을 나타낸다. Catechin류는 혈중의 콜레스테롤 저하, 혈압저하, 중금속류들의 제거작용, 항산화, 항균, 항충치, 항암, 항돌연변이 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 차나무 잎의 주요 catechin 화합물은 (+)-catechin(C), (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(EGC), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이다(Graham, 1992). 차나무과 식물에서 항산화물질의 분포를 비교해보기 위하여 메탄올 추출물을 TLC plate에 점적하여 항산화물질을 분리하여 DPPH 시약을 분무하여 발색시켰다. 그 결과(Fig. 2), 비쥬기나무(수피)에서 활성이 높은 밴드 4개(Rf 0.26, 0.16, 0.09, 0.03)를 확인할 수 있었으며, 이중 2개의 밴드(Rf 0.26, 0.09)는 EGC와 EGCG로 추정되었다. 다른 2개의 밴드(Rf 0.16, 0.03)는 이동거리가 달라서 표준물질로 사용된 catechin류와는 다른 물질로 판단되었으며, 우묵사스레피나무와 사스레피나무에서도 검출되었다. 그리고 후피향나무(잎과 수피)에서는 다른 식물에서는 검출되지 않은 3개의 밴드(Rf 0.54, 0.46, 0.44)가 검출되었는데, 이들 성분들도 표준물질로 사용된 catechin류와는 다른 성분인 것으로 사료된다.

페놀성물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 여러 생리활성 기능도 갖는다. Polyphenol은 항산화 기능뿐만 아니라 항혈전, 항암, 항세균, 항알레르기, 충치방지, 심장질환 및 당뇨병 예방에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있는데, flavonoid류가 주를 이루며 이외에도 coumarin류, tannin류가 있다. 따라서 Fig. 2에서 표준 catechin류와는 다른 것으로 보이는 Rf 0.54, 0.46, 0.44, 0.16, 0.03의 특성을 확인하기 위하여 toluene : ethyl acetate : formic acid(5:4:1, v/v/v)을 전개상으로 하여 박층 크로마토그래피를 실시한 후 Folin-Ciocalteu reagent 방법과 Ferric chloride-alcohol 방법으로 발색시켜 polyphenol류의 존재를 확인하였다(Fig. 3). Folin-Ciocalteu reagent 방법에 의해 Fig. 2에서 표준 catechin류와는 다른 것으로 보이는 밴드 중에서 후피향나무(잎과 수피)에서 3개의 밴드(Rf 0.54, 0.46, 0.44), 그리고 우묵

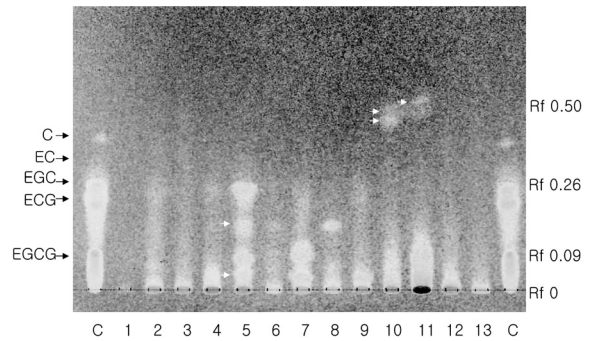


Fig. 2. Thin layer chromatography of plant extracts stained with DPPH solution. 1-3, *Camellia japonica* (seed, leaves, stem); 4-5, *Cleyera japonica* (leaves, stem bark); 6-7, *Eurya emarginata* (leaves, stem); 8-9, *Eurya japonica* (leaves, stem bark); 10-11, *Ternstroemia japonica* (leaves, stem bark); 12-13, *Thea sinensis* (leaves, stem); C, reference catechins. The arrows on the TLC plate indicate the bands not identified as compared with reference catechins.

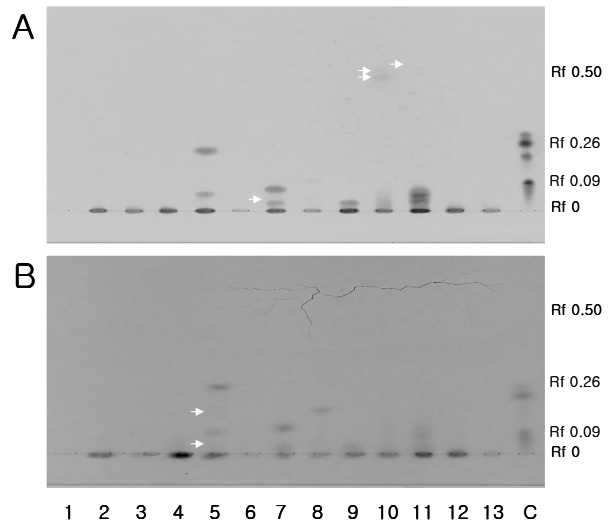


Fig. 3. Thin layer chromatography of plant extracts stained with folin-ciocalteu reagent (A) or ferric chloride-alcohol solution (B). 1-3, *Camellia japonica* (seed, leaves, stem); 4-5, *Cleyera japonica* (leaves, stem bark); 6-7, *Eurya emarginata* (leaves, stem); 8-9, *Eurya japonica* (leaves, stem bark); 10-11, *Ternstroemia japonica* (leaves, stem bark); 12-13, *Thea sinensis* (leaves, stem); C, reference catechins. The arrows on the TLC plates indicate the bands which were detected in this TLC assay from the bands not identified in Fig. 2.

사스레피(수피)와 사스레피(수피), 후피향나무(잎과 수피)에서 1개의 밴드(Rf 0.03)가 검출되었다(Fig. 3A). 그러나 Rf 0.16의 밴드는 검출되지 않았다. 반면에, Ferric chloride-

alcohol 방법에 의해 발색시켰을 때 비쭈기나무(수피)와 사스레피나무(잎)에서 Rf값이 0.16에 해당하는 밴드가 검출되었으며, 우묵사스레피나무(수피), 사스레피나무(수피), 후피향나무(수피)에서 Rf값이 0.03에 해당하는 미세한 밴드가 검출되었다(Fig. 3B). 따라서 Fig. 2에서 표준 catechin류와 다른 것으로 보이는 밴드들도 polyphenol류 일 것으로 추정된다. 차나무과 식물에 포함된 catechin류 이외의 Rf 0.54, 0.46, 0.44, 0.16, 0.03에 해당하는 성분들의 특성은 본 실험으로는 확인할 수 없으나 향후 HPLC, IR, NMR 등을 이용하여 물질분리 및 구조분석을 통해 확인하고자 한다. 그리고 앞으로의 연구는 항산화효과의 원인물질의 동정, 다른 추출물의 항산화력 유무, 그리고 다른 생리적 효과를 확인해야 할 것으로 보인다.

적 요

본 연구는 제주도에 자생하는 차나무과 식물을 대상으로 식품소재 또는 생약으로의 활용 방안을 모색하고자 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, aminopeptidase N(APN) 저해활성 및 α -amylase 저해활성을 조사하고, 항산화활성을 검색하고 TLC를 이용하여 분석하였다. ACE 저해활성은 후피향나무(수피)와 비쭈기나무(잎)에서 50% 이상의 저해활성을 보였으며, APN 저해활성은 비쭈기나무(잎)과 수피)와 후피향나무(수피)에서만 양의 활성을 보였다. α -amylase 저해활성은 동백나무(열매), 우묵사스레피나무(수피), 후피향나무(수피)와 차나무(줄기)에서 30% 이상의 저해활성을 보였다. 항산화활성은 비쭈기나무(수피), 후피향나무(수피), 차나무(잎)에서 30% 이상의 다소 높은 전자공여능을 나타내었다. 특히, 비쭈기나무(수피)는 dot-blot test에 의해 다른 종에 비해 활성이 높아 1.25 μ g/ml의 낮은 농도에서도 높은 항산화활성을 보였다. TLC 분석에 의해 비쭈기나무(수피)에서 EGC(Rf 0.26) 활성이 높았으며, 비쭈기나무, 우묵사스레피나무, 후피향나무의 수피에서 EGCG(Rf 0.09) 활성이 높게 검출되었다. 그리고, 표준 catechin류와는 다른 것으로 보이는 5개의 밴드(Rf 0.54, 0.46, 0.44, 0.16, 0.03)는 Folin-Ciocalteu Reagent 방법과 Ferric chloride-alcohol 방법을 이용하여 polyphenol류인 것으로 추정되었다. 이상의 결과를 토대로 사스레피나무를 제외한 차나무과 식물들은 생리활성이 높아 식품소재 또는 생약으로의 활용이 가능할 것으로 보이며, 활성성

분의 분리 및 동정 그리고 이들 물질을 이용한 임상실험 등 보다 심도있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 (주)아모레퍼시픽의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 진심으로 감사드립니다.

인용문헌

- Alscher R.G. and J.L. Hess. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton. pp.1-174.
- Bala, M., M.A.Q. Pasha, D.K. Bhardwaj and S. Pasha. 2002. Novel peptidomimics as angiotensin-converting enzyme inhibitions: A combinatorial approach. Bioorg. Med. Chem. 10(11):3685-3691.
- Bauvois B. and D. Dauzonne. 2006. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. Med. Res. Rev. 26(1):88-130.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.
- Branen, A.L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52:59-63.
- Choe, S. Y. and K. H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14(3):283-188.
- Chung, M.C., H.K. Chun, K.H. Han, H.J. Lee, C.H. Lee and Y.H. Kho. 1996. MR-387A and B, new aminopeptidase N inhibitors, produced by *Streptomyces neyagawaensis* SL-387. J. Antibiot. 49:99-102.
- Do, J.R., S.B. Kim, Y.H. Park, D.S. Kim, 1993. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by the components of traditional tea materials. Kor. J. Food Sci. Technol. 25:456-460.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science 201(4359):875-880.
- Graham, H.N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev. Med. 21(3):334-350.
- Gros, C., B. Giros and J.C. Schwartz. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. Biochemistry 24:2179-2185.

- Hong, J.H., B.S. Son, B.K. Kim, H.Y. Chee, K.S. Song, B.H. Lee, H.C. Shin, and K.B. Lee, 2006. Antihypertensive effect of *Ecklonia cava* extract. Kor. J. Pharmacogn. 37:200-205.
- Hou, W.C., R.D. Lin, K.T. Cheng, Y.T. Hung, C.H. Cho, C.H. Chen, S.Y. Hwang and M.H. Lee, 2003. Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. Phytomedicine 10:170-175.
- Hwang, E.J., Y.J. Cha, M.H. Park, J.W. Lee and S.Y. Lee, 2004. Cytotoxicity and chemosensitizing effect of camellia (*Camellia japonica*) tea extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33(3):487-493.
- Inze D. and M. Van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. Curr. Opin. Biotech. 6:153-158.
- Lee, S. Y., E. J. Hwang, G. H. Kim, Y. B. Choi, C. Y. Lim and S. M. Kim. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L.. Korean J. Med. Crop Sci. 13(3):93-100.
- Lee, W. C. 1996. Lineamenta florae Koreae(I). Academy Book, Seoul. pp.1687.
- Lester, P. and N.G. Alexander. 1993. Oxygen radicals in biological systems. Academic press INC., San Diego. pp.635-650.
- Oh, S. J. and S. C. Koh. 2002. Antioxidative activities of solvent fractions from the fruits of several evergreen plants native to Jeju-Do. J. Basic Sciences, Cheju Nat'l Univ. 15(2):69-75.
- Oh, S.J., S.H. Kim, S.K. Kim, Y.J. Baek and K.H. Cho. 1997. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin and trypsin. Korean J. Food Sci. Technol. 29(6):1316-1318.
- Ondetti, M.A., B. Rubin and D.W. Cushman. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin. Science 196:441-444.
- Park, S.Y., H.C. Yang, J.Y. Moon, N.H. Lee, S.J. Kim, J.H. Kang, Y.K. Lee, D.B. Park, E.S. Yoo and H.K. Kang. 2005. The cytotoxicity of eutigosides from *Eurya emarginata* against HL-60 promyelocytic leukemia cells. Arch. Pharm. Res. 28(9):1047-1052.
- Puls, W and U. Keup. 1973. Influence of an α -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading tests in rats, dogs and man. Diabetologia 9:97-101.
- Rhinehart, B.L., K.M. Robinson, P.S. Liu, A.J. Payne, M.E. Wheatley and S.R. Wanger. 1987. Inhibition of intestinal disaccharidase and suppression of blood glucose by a new α -glucohydrolase inhibitor-MDL 25. J. Pham. Exp. Ther. 241:915-920.
- Satoyama, T., T. Hara, M. Murata and Y. Fujio. 1998. A simple assay method for α -amylase using microplates. Nippon Nogeikagaku Kaishi 72:933-936.
- Sealey, J.F. and J.H. Laragh. 1990. Pathophysiology, diagnosis and management. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. Raven Press, LTD, New York. pp.1287-1317.
- Shim, K. H., Y. I. Bae and J. S. Moon, 1994. Screening and characterization of α -amylase inhibitors from cereals and legumes in Korea. Korean J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products 1(2):117-124.
- Shin, M. H. 2001. Antioxidative constituents from the fruits of *Ternstroemia japonica* Thunberg. PhD Thesis, Pusan National University pp.158.
- Toeller, M. 1994. α -Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. Eur. J. Clin. Invest. 24:31-35.
- Yamamoto, N., 1997. Antihypertensive peptides derived from food proteins. Biopolymers 43:129-134.
- You, H. S. 2008. Phytochemical constituents and biological activity of *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino. Ph D thesis, Sungkyunkwan University. pp.98.

(접수일 2010.5.25; 수락일 2010.9.1)