

## 제주 자생 식물들의 항산화 활성 능력 검색

장현주<sup>1</sup>, 부희정<sup>2</sup>, 이선주<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>제주여자고등학교, <sup>2</sup>제주대학교 생명과학기술혁신센터, <sup>3</sup>제주대학교 화학-코스메틱스학과

## Screening for Antioxidative Activity of Jeju Native Plants

Hyun-Ju Jang<sup>1</sup>, Hee Jung Bu<sup>2</sup> and Sunjoo Lee<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Jeju Girls High School, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Biotechnology Innovation center, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>3</sup>Faculty of Chemistry & Cosmetics, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

**Abstract** - We selected 8 plants among 11 Jeju native plants to search useful natural anti-oxidants by determining the amount of total polyphenols and the various anti-oxidative effects. Ethyl acetate extracts of *Castanopsis sieboldii* (Makino) Hatus. and butanol extracts of *Oenothera laciniata* Hill showed strong DPPH free radical scavenging effect. The IC<sub>50</sub> value of each solvent extract was 1.6 µg/ml and 2.4 µg/ml, respectively. The ethyl acetate fraction of *Castanea crenata* Siebold & Zucc exhibited strong inhibition against nitric oxide production. For the inhibition of xanthine oxidase, the ethyl acetate extracts of *Castanea crenata* Siebold & Zucc showed strong inhibition activity with 16 µg/ml of its IC<sub>50</sub>. The ethyl acetate extracts from *Castanopsis sieboldii* (Makino) Hatus showed strong superoxide scavenging effect with 7 µg/ml of its IC<sub>50</sub>. The hydroxyl radical scavenging activity of butanol extract of *Castanopsis sieboldii* (Makino) Hatus was 76%. Therefore, with more researches on purification and identification of active compounds, plants studied are expected to be natural sources for the functional food/cosmeceuticals with anti-oxidative properties.

**Key words** - Superoxide radical scavenging, Xanthine oxidase, Hydroxy radical, Nitric oxide, Anti-oxidation

## 서 언

최근 생활수준이 급속하게 향상됨에 따라 개인 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며, 풍요로움과 건강사회가 구현되는 복지사회국가를 건설하고자 하는 것이 국가적으로 중요한 목표가 되고 있다. 이에 따라서 인간이 섭취하고 있는 식품이나 자연계에 존재하고 있는 식물체로부터 생리활성 기능을 나타내는 물질을 찾아내어 각종 질병의 치료제로 사용하기 위해 새로운 의약품의 소재개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Al-saikhan *et al.*, 1995; Ham *et al.*, 1998; Azuma *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2013). 그 중에서도 활성산소가 인체에 미치는 여러 가지 질환들에 대한 관심이 증가하면서 항산화제에 대한 연구 역시 증가하고 있다. 분자 내 활성산소를 가지는 reactive oxygen species (ROS)에는 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 비 라디칼종과 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH과 같은 산소중심의 라디칼들, 그리고 생체 성분과

ROS와 반응에서 유리된 ROO·, RO·, ROOH 및 HOCl 등이 포함된다(Ferra and Torres, 2003). 하지만 생체에는 계속해서 생기는 활성 산소종들을 제거하는 항산화효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화 화제(tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)들로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에서 세포 기능을 유지한다(Kim *et al.*, 2001). 이처럼 활성 산소종은 정상적인 대사 과정에서도 생성되며, 질병상태나 산화적인 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성되는데 특히 피부는 항상 산소와 태양 자외선에 노출되기 때문에 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 지속적으로 발생한다.

항산화제란 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 산화 억제 기능을 하는 물질 또는 효소로서 free radical의 생성 억제 및 소거를 촉진할 뿐만 아니라 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 인자들을 일컫는다. 항산화제로는 합성물질인 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene

\*교신저자(E-mail) : sunjoo\_ucb@hanmail.net

(BHT), propyl gallate (PG) 등이 있으며 천연 항산화제에는 vitamin E 및 carotinoid 등이 있다. 또한 항산화 효소로는 Hydrogen peroxidase, superoxide dismutase (SOD), catalase 등이 생체 내에 존재한다. 현재 상용되고 있는 합성 항산화제인 BHT와 BHA는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취 시 심각한 여러 질병을 유발 시킬 수 있다(Choe and Yang, 1982). 또한 합성 항산화제는 이취(異臭)가 있고 고온에서 불안정하며(Chang *et al.*, 1977), 기형 발생인자 발암물질이 될 수 있고(Schafer and Arnrich, 1984), 특히 합성 항산화제의 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 발생시킨다. 따라서 생체 부작용이 없고 활성 산소를 제거하여 질병예방 및 노화억제에 효과가 있으며, 항산화력이 강한 천연 항산화제를 동·식물로부터 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Doh *et al.*, 2011).

본 연구에서는 제주도에 자생하는 식물 11종, 구실갓밤나무 수피(*Catanopsis sieboldii* (Makino) Hatus), 자주괴불주머니(*Corydalis incisa* (Thunb.) Pers.), 애기달맞이(*Oenothera laciniata* Hill), 큰천남성(*Arisaema rigeas* (Thunb.) Schott), 광대나물(*Lamium amplexicaule* sp. L.), 밤나무(*Castanea crenata* Siebold & Zucc), 산국(*Deadranthem boreale* (Makino) Lingex Kitam.), 약모밀(*Houttuynia cordata* sp. Thunb.), 산딸나무(*Cornus kousa* sp. F. Buerger ex Miquel), 곰취(*Ligularia fischeri* sp. (Ledeb.) Turcz.), 떡쭉(*Gnaphalium affine* D. Don)을 대상으로 항산화와 관련된 총 폴리페놀의 함량, DPPH free radical 소거 활성 측정, Nitric oxide 소거 활성 측정, Xanthine oxidase 활성 억제 및 Superoxide 소거 활성 측정과 Hydroxy radical 소거 활성을 측정한다. 그리고 항산화 기능이 좋고 폴리페놀량이 많은 식물 8종에 대하여 유기용매 분획을 이용하여 추출 분리하고 각 분획별로 항산화 활성을 조사하여, 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 실험방법

### 실험재료

구실갓밤나무는 5월에 제주대학교 근처에서 채집하였으며 수피를 이용하여 실험하였고, 5월 제주대학교 근처에서 채집한 자주괴불주머니의 전초를 실험하였다. 애기달맞이는 8월에 함덕 해수욕장 근처에서 채집한 것의 지상부, 5월에 조천읍 선흘리 근처에서 채집한 큰천남성의 지상부, 광대나물은 3월 제주대학교 근처에서 채집한 전초, 11월 제주대학교 근처에서 채집한

밤나무의 잎, 5월에 오라동 근처에서 채집한 산국의 꽃을 실험에 사용하였다. 약모밀의 전초를 6월에 제주대학교 근처에서 채집하여 사용하였고, 6월 제주대학교 근처에서 채집한 산딸나무의 잎, 6월에 제주대학교 근처에서 채집한 곰취의 전초, 5월에 제주대학교 근처에서 채집한 떡쭉의 전초를 실험에 사용하였다.

### 추출물의 조제

채취한 제주 자생식물 11종을 음지에서 통풍건조 하였다. 건조된 시료를 잘게 파쇄하여 미세 분말로 만든 후, 추출용매인 80% methanol에 한 달 동안 침지하여 추출하여 농축 및 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다.

Crude methanol extracts 11종에 대해 폴리페놀 함량과 DPPH free radical 소거 활성 측정, nitric oxide 소거 활성 측정, xanthine oxidase 활성 억제 및 superoxide 소거 활성 측정과 hydroxy radical 소거 활성을 측정 실험을 수행하여 기능이 좋은 8종(구실갓밤나무, 애기달맞이, 밤나무, 산국, 약모밀, 산딸나무, 곰취, 떡쭉)의 식물종에 대해 유기 용매 분획을 실시하여 추출 분리하였다. 획득한 각각의 methanol (MeOH) 추출물을 일정량의 물에 현탁시킨 후, n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH)을 순차적으로 이용하여 용매분획 하였다.

### 총 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 실시하였다(Gutfinger, 1981). 먼저 tannic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 각 시료 추출물을 1 mg/ml 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 0.2 ml를 시험관에 취하고 증류수 1.8 ml를 가하여 total volume이 2 ml가 되도록 희석하였다. 여기에 0.2 ml Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.4 ml를 가하여 혼합하고, 증류수 1.4 ml를 가하여 total volume이 4 ml가 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### DPPH free radical 소거 활성 측정

각 시료 추출물의 전자공여능(electron donating ability, EDA%) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다(Blois, 1958). 각 시료 추출물을 methanol에 녹여 여러 농도로 준비한 뒤, 96 well plate에 100 μl씩 분주하고, ethanol에 녹인 0.4 mM DPPH를 동량 첨가하여 실온의 암

실에서 30분간 방치한 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid, quercetin, butylated hydroxy anisole (BHA)를 농도별로 조제하여 흡광도를 측정하고 시료와 비교하였다. DPPH free radical 소거활성은 다음 식 1로부터 산출하여 전자공여능(EDA%)에 의한 환원력으로 항산화능을 표시하였고(Inkeda and Fukuzume, 1977), 항산화능을 비교 검토하기 위해서 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하여 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical 소거활성 (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (\text{식 1})$$

A<sub>sample</sub> = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도, A<sub>control</sub> = 시료 대신 methanol을 첨가한 반응액의 흡광도를 나타낸다.

### Nitric oxide 소거 활성 측정

아질산염 소거능 측정(nitrite scavenging ability)은 Kato *et al.* (1987)의 방법을 응용하여 측정하였다. 자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거 활성을 검색하였다(Green *et al.*, 1982). PBS (pH 6.8)에 희석한 여러 농도의 시료 각각을 96 well plate 에 50 µl씩 분주하고, 10 mM SNP 용액을 50 µl 첨가하여 실온의 25°C에서 2시간 동안 명반응 시켰다. 반응이 끝난 후 반응액에 Griess시약 [2.5% (v/v) phosphoric acid에 1% (w/v) sulfanilamide와 0.1% (w/v) naphylethylenediamine을 1:1로 혼합한 것]을 사용직전에 조제해 100 µl씩 가하고 ELISA Reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 nitric oxide 소거활성을 측정하였다. 대조군로 quercetin의 흡광도를 측정하여 비교하였고, 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 이용하여 nitric oxide 소거활성을 표시하였다.

### Xanthine oxidase 억제 효과 및 Superoxide 소거 활성 측정

Hypoxanthine을 분해하여 uric acid와 superoxide를 생성시키는 xanthine/xanthine oxidase 반응에서 uric acid의 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다(Cheng *et al.*, 1998). 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 1 mM xanthine과 2 mM EDTA 첨가하여 반응 용액을 준비하고, 여러 농도로 희석시킨 각 시료 추출물을 96 well

plate 에 50 µl씩 분주한 뒤, 위 반응 용액을 50 µl 첨가하였다. 이 때 enzyme으로 50 mU/ml xanthine oxidase를 100 µl씩 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였으며, 반응 혼합 용액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 UV-Visible spectrophotometer로 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide 소거 활성은 위 반응 용액에 0.05 mM NBT를 첨가하여 위 방법과 동일하게 행하고 UV-Visible spectrophotometer로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 억제 반응에서 양성 대조군으로 allopurinol을 사용하고 superoxide 소거 활성의 양성대조군로 SOD (Superoxide dismutase)를 사용하였으며, 각각 생성된 uric acid와 superoxide 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 이용하여 저해 활성을 표시하였다.

### Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical은 과산화수소와 2가의 철염(Fe<sup>2+</sup>)을 첨가하는 Fenton 반응에 의해 생성된다(Kim *et al.*, 2005). Hydroxyl radical은 불안정하기 때문에 Chung *et al.* (1997)의 방법을 이용하여 Hydroxyl radical에 의해 deoxyribose의 분해산물인 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)의 양을 측정하였다. 각 시료 추출물 200 µl에 10 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 용액 200 µl와 10 mM EDTA 용액 200 µl, 10 mM 2-deoxyribose 용액 200 µl를 첨가하여 잘 혼합한 후, 0.1 M phosphate buffer 용액(pH 7.4) 1 ml를 가하여 total volume이 1.8 ml가 되도록 희석하였다. 이 반응용액에 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µl를 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응을 진행시켰다. 여기에 2.8% trichloroacetic acid 1 ml를 넣고 반응을 시키고 1% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하여 100°C에서 10분간 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 화합물 함량 및 분석

폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(Yoshizawa *et al.*, 1987). 제주도에서 자생하고 있는 식물 11종의 methanol 추출물의 phenol성 화합물의 함량 결과는 Table 1과 같다.

폴리페놀 함량과 5가지 항산화 실험을 수행한 결과 기능이 좋

Table 1. Contents of total polyphenols in methanol extracts in Jeju plants

Sample No.	Scientific name	Total polyphenols ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>z</sup>	Total phenol content (%)
1	<i>Catanopsis sieboldii</i> (Makino) Hatus (구실잣밤나무)	278 $\pm$ 5 <sup>y</sup>	28
2	<i>Corydalis incisa</i> (Thunb.) Pers. (괴불주머니)	< 5	< 0.5
3	<i>Oenothera laciniata</i> Hill (애기달맞이)	58 $\pm$ 3	6
4	<i>Arisaema rigeas</i> (Thunb.) Schott (큰천남성)	< 5	< 0.5
5	<i>Lamium amplexicaule</i> sp. L. (광대나물)	< 5	< 0.5
6	<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc (밤나무)	92 $\pm$ 1	9
7	<i>Deadranthema boreale</i> (Makino) Lingex Kitam. (산국)	< 5	< 0.5
8	<i>Houttuynia cordata</i> sp. Thunb. (약모밀)	19 $\pm$ 1	2
9	<i>Cornus kousa</i> sp. F. Buerger ex Miquel (산딸나무)	283 $\pm$ 3	28
10	<i>Ligularia fischeri</i> sp. (Ledeb.) (곰취)	50 $\pm$ 1	5
11	<i>Gnaphalium affine</i> D. Don (떡쭈)	89 $\pm$ 5	9

<sup>z</sup>Milligrams of total polyphenol content/g of methanol extract of plants based on tannic acid as standard.

<sup>y</sup>Each value is mean  $\pm$  S.D. (n $\geq$ 3).

Table 2. Contents of total polyphenols in solvent fractions in Jeju plants

Sample No.	Fractions	Total polyphenols ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>z</sup>	Total phenol content (%)	Sample No.	Fractions	Total polyphenols ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>z</sup>	Total phenol content (%)
1	Hexane	< 5 <sup>y</sup>	< 0	8	Hexane	3.0 $\pm$ 0.2	0.3
	EtOAc	487 $\pm$ 3	49		EtOAc	145 $\pm$ 4	15
	BuOH	280 $\pm$ 3	28		BuOH	55.9 $\pm$ 0.6	6
	H <sub>2</sub> O	210.0 $\pm$ 0.4	21		H <sub>2</sub> O	< 5	< 0
3	Hexane	< 5	< 0	9	Hexane	< 5	< 0
	EtOAc	122 $\pm$ 1	12		EtOAc	216 $\pm$ 1	22
	BuOH	506 $\pm$ 16	51		BuOH	234 $\pm$ 3	23
	H <sub>2</sub> O	239 $\pm$ 2	24		H <sub>2</sub> O	253 $\pm$ 4	25
6	Hexane	113 $\pm$ 5	11	10	Hexane	< 5	< 0
	EtOAc	558 $\pm$ 29	56		EtOAc	203 $\pm$ 1	20
	BuOH	712 $\pm$ 20	71		BuOH	247 $\pm$ 2	25
	H <sub>2</sub> O	144 $\pm$ 3	14		H <sub>2</sub> O	< 5	< 0
7	Hexane	< 5	< 0	11	Hexane	< 5	< 0
	EtOAc	573 $\pm$ 13	57		EtOAc	334 $\pm$ 4	33
	BuOH	308 $\pm$ 5	31		BuOH	89 $\pm$ 1	9
	H <sub>2</sub> O	83 $\pm$ 2	8		H <sub>2</sub> O	< 5	< 0

<sup>z</sup>Milligrams of total polyphenol content/g of solvent fractions of methanol extract for plants based on tannic acid as standard.

<sup>y</sup>Each value is mean  $\pm$  S.D.(n  $\geq$  3).

은 식물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하여 추출 분리하여 분획물을 얻었으며, 시료 분획물의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 시료 분획물의 총 폴리페놀 함량 분석 결과 EtOAc 층과 BuOH 층에서 높은 함량을 보이고 그 중 밤나

무의 BuOH 층에서 712  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 산국의 EtOAc 층과 밤나무의 EtOAc 층, 애기달맞이의 BuOH 층이 각각 573  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 558  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 506  $\mu\text{g}/\text{mg}$  순으로 나타났다. 항산화 활성 결과와 총 폴리페놀 화합물의 함량을 비교한

결과, 총 폴리페놀 화합물의 함량이 높은 분획물이 비교적 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

각 식물체마다 총 폴리페놀양은 Table 1의 값보다 Table 2에서의 값이 크다. 이것은 메탄올 조추출물에 더 많은 다른 성분들이 포함되어 있어서 상대적으로 농도가 낮게 얻어진 것이고 분획이 진행됨에 따라 불순물 양이 줄어들어 농도는 증가하게 나타난 것이다.

**DPPH free radical 소거 활성**

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 안정한 유리기로 cysteine, glutathion과 같은 황 함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine (p-phenylenediamine, p-aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과는 Table 3과 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 각 추출물의 IC<sub>50</sub>값은 곱취가 8.6 µg/ml로 비교적 높은 radical 소거 활성을 보이는 것

으로 나타났으며 시료 분획물에서 위와 동일한 방법으로 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 IC<sub>50</sub>은 구실잣밤나무의 분획물 중 EtOAc 층의 1.6 µg/ml, 애기달맞이의 분획물은 BuOH 층에서 IC<sub>50</sub>이 2.4 µg/ml로 가장 높은 소거 활성을 나타내어 대조군 Vitamin C (2.7 µg/ml)보다 더 좋은 활성을 나타내었다. 다른 시료들과 달리 EtOAc 층보다 H<sub>2</sub>O층에서 좋은 활성을 나타내었는데, IC<sub>50</sub>값은 각각 H<sub>2</sub>O층에서 2.5 µg/ml, EtOAc 층에서 3.3 µg/ml로 대조군인 Vitamin C (2.7 µg/ml) 및 BHA (3.4 µg/ml)와 유사한 소거 활성을 나타내어 매우 우수한 free radical 소거 활성을 가짐을 알 수 있었다. 밤나무의 분획물도 BuOH 층에서 IC<sub>50</sub>이 3.1 µg/ml로 가장 좋은 소거 활성을 보여 BHA (3.4 µg/ml)보다 좋은 활성을 나타내었고, 약모밀의 분획물의 소거 활성은 EtOAc 층에서 12.2 µg/ml, 산딸나무 분획물은 특이하게 H<sub>2</sub>O층에서 4.7 µg/ml로 가장 높은 활성이 측정되었고, 곱취 분획물은 EtOAc 층에서 3.7 µg/ml로 대조군 BHA (3.4 µg/ml)와 유사한 활성을 확인할 수 있었으며, 떡쭉 분획물은 BuOH 층에서 4.5 µg/ml의 소거활성을 나타내었다(Table 4).

Table 3. Anti-oxidative activities of methanol extracts in Jeju plants

Sample No.	DPPH free radical scavenging	Nitric oxide scavenging activity	Xanthine oxidase inhibition activity	Super -oxide scavenging activity		Hydroxyl radical scavenging activity
	(%)	IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (µg/ml)	(%)	IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (µg/ml)	(%)
1	90 ± 0.3 <sup>y</sup>	19 ± 1 <sup>y</sup>	38 ± 2 <sup>y</sup>	219 ± 1 <sup>y</sup>	> 500	70 ± 2
2	7 ± 0.2	154 ± 5	27 ± 6	> 500	127 ± 19	72 ± 4
3	42 ± 0.2	96 ± 1	47 ± 2	303 ± 12	292 ± 24	68 ± 5
4	3 ± 0.5	248 ± 3	23 ± 1	> 500	247 ± 12	72 ± 1
5	7 ± 0.8	113 ± 1	41 ± 0.4	> 500	47 ± 11	67 ± 3
6	46 ± 2	106 ± 2	55 ± 0.3	242 ± 11	105 ± 1	74 ± 1
7	19 ± 1	53 ± 1	34 ± 1	282 ± 5	340 ± 9	66 ± 3
8	26 ± 3	31 ± 3	22 ± 6	> 500	34 ± 4	69 ± 6
9	91 ± 0.6	21 ± 0.4	39 ± 0.2	59 ± 3	56 ± 3	70 ± 4
10	77 ± 6	8.6 ± 1	32 ± 0.3	> 500	37 ± 8	67 ± 1
11	49 ± 0.3	20.8 ± 0.1	27 ± 0.1	140 ± 4	2 ± 0.3	69 ± 3
Vitamin C	93 ± 0.2	2.7 ± 0.1				77 ± 1
BHA	92 ± 0.1	3.4 ± 0.1				73 ± 2
Quercetin			77 ± 1			
Allopurinol				7 ± 0.8	16 ± 0.8	

<sup>z</sup>IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

<sup>y</sup>Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

Table 4. DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts in Jeju plants

Sample No.	Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (μg/ml)	Sample No.	Fractions	IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (μg/ml)
1	Hexane	> 100 <sup>y</sup>	8	Hexane	> 100 <sup>y</sup>
	EtOAc	1.6 ± 0.5		EtOAc	12.2 ± 0.5
	BuOH	5.8 ± 0.3		BuOH	28 ± 2
	H <sub>2</sub> O	6.2 ± 0.3		H <sub>2</sub> O	50.2 ± 0.1
3	Hexane	> 100	9	Hexane	54 ± 2
	EtOAc	3.3 ± 0.2		EtOAc	6.8 ± 0.7
	BuOH	2.4 ± 0.1		BuOH	6.1 ± 0.3
	H <sub>2</sub> O	2.5 ± 0.2		H <sub>2</sub> O	4.7 ± 0.1
6	Hexane	> 100	10	Hexane	> 100
	EtOAc	8.7 ± 0.2		EtOAc	3.7 ± 0.2
	BuOH	3.1 ± 0.1		BuOH	4.5 ± 0.1
	H <sub>2</sub> O	16 ± 3		H <sub>2</sub> O	37.2 ± 0.8
7	Hexane	40 ± 4	11	Hexane	> 100
	EtOAc	2.5 ± 0.1		EtOAc	6.8 ± 0.3
	BuOH	4.1 ± 0.3		BuOH	4.5 ± 0.2
	H <sub>2</sub> O	> 100		H <sub>2</sub> O	52 ± 3
Vitamin C	2.7 ± 0.1	BHA	3.4 ± 0.1		

<sup>z</sup>IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

<sup>y</sup>Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

**Nitric oxide 소거 활성**

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진(Bu *et al.*, 2004) 질소산화물(NO)은 세포독성이 강하며 다량의 NO가 생성되면 nitroization, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타낸다. 본 연구에서 각 시료 추출물의 nitric oxide 생성 저해 활성은, nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 NO를 과량 발현시키고, Griess 시약을 사용하여 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 아질산염의 양을 측정하는 방법으로 산출하였다(Ko, 2005). Quercetin을 대조군로 하여 각 시료에 대한 저해 활성 측정 결과는 Table 3과 같다.

측정 결과 quercetin은 500 μg/ml 농도에서 77%의 nitric oxide 생성 저해 활성을 보인데 반해 제주도에서 자생하고 있는 식물 11종의 경우 nitric oxide 생성 저해 활성이 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. Methanol 추출물 중에서 밤나무 추출물의 nitric oxide 생성 저해율이 55%로 가장 높은 저해율을 보였으며, 분획물인 경우는 대부분 EtOAc 층에서 우수한 저해 활성을 나타내었다. 특히 밤나무의 EtOAc 층이 85%의 저해율을 보여 대조군인 quercetin (77%)보다 높은 저해 효과를 보였고, 산

국의 EtOAc 층에서 62%, 애기달맞이의 EtOAc 층에서 56%, 떡썩의 EtOAc 층에서 54%, 산딸나무의 EtOAc 층에서 54%, 약모밀의 EtOAc 층에서 51%의 Nitric oxide 생성 저해율을 확인 할 수 있었다(Table 5).

**Xanthine oxidase 억제 효과**

Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Xanthine oxidase 저해제는 통풍, 신장결석, 허혈, 심근증을 일으키는 요산혈증에 대한 치료제로 사용되어 왔으며, 통풍치료에 사용되는 물질로는 allopurinol, alloxanthine 등이 알려져 있다(Ko, 2005). Xanthine oxidase의 억제 효과는 allopurinol을 대조군로 이용하여 측정하였으며 결과는 Table 3에 나타내었다. Xanthine oxidase의 억제 효과를 측정한 결과 IC<sub>50</sub>값은 산딸나무의 추출물에서 59 μg/ml로 가장 높은 억제 효과를 보였으며, 메탄올 추출물에서는 억제 효과가 그다지 크지 않은 것으로 조사되었다. 동일한 방법으로 시료 분획물의 억제 효과 측정 결과 IC<sub>50</sub>값은

Table 5. Nitric oxide scavenging activities of solvent fractions in Jeju plants

Sample No.	Fractions <sup>z</sup>	Nitric oxide scavenging activity (%)	Sample No.	Fractions <sup>z</sup>	Nitric oxide scavenging activity (%)
1	Hexane	20 ± 2 <sup>y</sup>	8	Hexane	21 ± 3
	EtOAc	41 ± 1		EtOAc	51 ± 2
	BuOH	44 ± 1		BuOH	31 ± 1
	H <sub>2</sub> O	39 ± 1		H <sub>2</sub> O	16 ± 0.7
3	Hexane	43 ± 1	9	Hexane	36 ± 0.6
	EtOAc	56 ± 0.3		EtOAc	54 ± 0.4
	BuOH	54 ± 2		BuOH	44 ± 0.6
	H <sub>2</sub> O	49 ± 0.6		H <sub>2</sub> O	40 ± 2
6	Hexane	56 ± 2	10	Hexane	5 ± 0.1
	EtOAc	85 ± 6		EtOAc	39 ± 0.7
	BuOH	71 ± 0.2		BuOH	41 ± 0.2
	H <sub>2</sub> O	55 ± 1		H <sub>2</sub> O	15 ± 1
7	Hexane	10 ± 5	11	Hexane	32 ± 2
	EtOAc	62 ± 0.5		EtOAc	54 ± 2
	BuOH	42 ± 0.2		BuOH	19 ± 1
	H <sub>2</sub> O	9 ± 0.9		H <sub>2</sub> O	5 ± 1
Quercetin		77 ± 1			

<sup>z</sup>The final concentration of methanol extracts for reaction was 500 µg/ml.

<sup>y</sup>Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

밤나무의 분획물중 EtOAc 층에서 16 µg/ml, 산국의 EtOAc 층에서 17 µg/ml로 대조군 allopurinol의 IC<sub>50</sub>값인 7 µg/ml와 비교하였을 때 비교적 우수한 xanthine oxidase 억제 효과를 나타낼 수 있었다. 산딸나무의 분획물은 EtOAc 층에서 57 µg/ml, 애기달맞이의 EtOAc 층에서 74 µg/ml, 떡썩의 EtOAc 층에서 74 µg/ml, 구실잣밤나무의 EtOAc 층에서 87 µg/ml로 분획물의 EtOAc 층에서 활성을 확인할 수 있었다. 그러나 약모밀과 곰취의 분획물은 Hexane 층, EtOAc 층, BuOH 층, H<sub>2</sub>O층에서 모두 IC<sub>50</sub>값이 500 µg/ml 이상으로 조사되어 활성 억제 효과가 크지 않은 것으로 나타났다(Table 6).

### Superoxide 소거 활성

생명체에 존재하는 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 superoxide를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉진하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 자신은 분해하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다(Shon *et al.*, 2004). 제주 도자생식물 11종의 superoxide radical 소거 효과를 평가하여

측정결과를 Table 3, 용매 추출물 8종에 대한 용매 분획물의 superoxide 소거 활성은 측정된 결과를 Table 6에 나타내었다. 구실잣밤나무의 메탄올 추출물에서는 활성이 매우 좋지 않으나 놀랍게도 에틸아세테이트 분획층은 IC<sub>50</sub>값이 7 µg/ml (Table 6)으로 가장 우수한 소거 효과를 나타내어, 대조군인 allopurinol의 IC<sub>50</sub>값 16 µg/ml 보다 높은 소거 활성을 보였다. 밤나무는 EtOAc 층에서 9 µg/ml, 산국의 EtOAc층에서 9 µg/ml, 애기달맞이의 BuOH 층에서 13 µg/ml, 곰취의 EtOAc층에서 16 µg/ml로 나타나 allopurinol의 IC<sub>50</sub>값 16 µg/ml와 비교했을 때, 매우 우수한 활성을 확인할 수 있었으며, 떡썩의 EtOAc 층에서 19 µg/ml, 산딸나무의 EtOAc 층에서 21 µg/ml, 약모밀의 EtOAc 층에서 79 µg/ml로 조사되어 비교적 좋은 소거 활성을 보였다. 용매분획 실험에서 제외되었던 광대나물은 메탄올 추출물에서 중간 정도의 활성을 보였으나, 이보다 활성이 저조했던 구실잣밤나무, 산국, 밤나무 등의 용매 분획층에서는 매우 좋은 활성을 가진 것으로 보아, 광대나물도 용매 분획을 진행하면 더 강력한 superoxide 소거 활성을 가진 물질을 발굴할 수 있다고 판단된다.

Table 6. Xanthine oxidase inhibition and superoxide scavenging activities of solvent fractions in Jeju plants

Sample No.	Fractions	Xanthine oxidase inhibition activities IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (μg/ml)	Superoxide scavenging activities IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Sample No.	Fractions	Xanthine oxidase inhibition activities IC <sub>50</sub> <sup>z</sup> (μg/ml)	Superoxide scavenging activities IC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	Hexane	> 500 <sup>y</sup>	> 500 <sup>y</sup>	8	Hexane	> 500 <sup>y</sup>	107 ± 0.2
	EtOAc	87 ± 5	7 ± 0.7		EtOAc	> 500	79 ± 2
	BuOH	304 ± 14	17 ± 0.6		BuOH	> 500	448 ± 21
	H <sub>2</sub> O	287 ± 16	15 ± 2		H <sub>2</sub> O	> 500	> 500
3	Hexane	356 ± 31	190 ± 15	9	Hexane	> 500	86 ± 4
	EtOAc	74 ± 9	38 ± 2		EtOAc	57 ± 2	21 ± 1
	BuOH	163 ± 5	13 ± 0.1		BuOH	243 ± 22	23 ± 1
	H <sub>2</sub> O	234 ± 21	25 ± 1		H <sub>2</sub> O	340 ± 14	24 ± 2
6	Hexane	> 500	472 ± 22	10	Hexane	> 500	264 ± 3
	EtOAc	16 ± 0.1	9 ± 1		EtOAc	> 500	16 ± 0.4
	BuOH	43 ± 26	14 ± 1		BuOH	> 500	30 ± 5
	H <sub>2</sub> O	> 500	48 ± 10		H <sub>2</sub> O	> 500	170 ± 13
7	Hexane	106 ± 3	168 ± 5	11	Hexane	377 ± 5	153 ± 3
	EtOAc	17 ± 0.4	9 ± 0.8		EtOAc	74 ± 1	19 ± 1
	BuOH	352 ± 9	65 ± 0.7		BuOH	> 500	87 ± 5
	H <sub>2</sub> O	> 500	> 500		H <sub>2</sub> O	> 500	> 500
	Allopurinol	7 ± 0.8	16 ± 0.8				
	SOD <sup>x</sup>		2 ± 0.3				

<sup>z</sup>IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

<sup>y</sup>Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

<sup>x</sup>Superoxide dismutase.

### Hydroxyl radical 소거 활성

Hydroxyl radical은 활성산소 중에서도 강력한 것으로서, hydroxyl radical을 소거하는 효과는 항산화제로서 그 의미가 크다고 할 수 있다. 따라서 제주도에서 자생하고 있는 식물 11종의 methanol 추출물과 추출물로부터 분리한 분획물들의 hydroxyl radical에 대한 포착효과를 측정하기 위해 Fenton 반응으로 hydroxyl radical을 생성시키고, 생성된 hydroxyl radical에 의해 핵산의 구성당인 deoxyribose가 분해라는 정도를 TBA 발색법을 이용해 측정하였다(Bu *et al.*, 2004). 결과는 Table 3에 나타내었으며, 시료농도 100 μg/ml에서 비교한 결과 밤나무 methanol 추출물에서 74%로 Vitamin C 77%와 BHA 73%의 소거 활성과 비교하였을 때 비슷한 활성 효과를 확인할 수 있었다. 분획물인 경우 구실잣밤나무는 BuOH 층에서 76%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 보여, 대조군인 Vitamin C (77%)의 소거 활성보다 낮았으나, BHA (73%)보다 좋은 소거 활

성을 확인할 수 있었고, 애기달맞이의 H<sub>2</sub>O층에서 71%, 떡쭈은 EtOAc 층에서 70%, 산딸나무의 H<sub>2</sub>O층에서 71%, 약모밀은 BuOH 층에서 68%, 곰취는 H<sub>2</sub>O층에서 71%, 밤나무는 H<sub>2</sub>O층에서 71%, 산국의 H<sub>2</sub>O층에서 68%의 소거 활성을 보였다(Table 7).

이처럼 총 폴리페놀 화합물의 함량과 항산화 활성을 비교한 결과, 대체적으로 총 폴리페놀 화합물의 함량이 높은 분획물이 비교적 높은 항산화 활성을 나타내는 경향을 확인할 수 있었다. 현재 국내외적으로 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 제주지역에서 자생하는 천연물의 항산화 효과에 대한 연구는 그 효용 가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 실험 연구의 결과를 토대로 항산화 효과가 우수한 식물종에 대해 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 함양증이나 항염, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.



Table 7. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent fractions in Jeju plants

Sample No.	Fractions <sup>z</sup>	Hydroxyl radical scavenging activity (%) <sup>y</sup>	Sample No.	Fractions <sup>z</sup>	Hydroxyl radical scavenging activity (%)
1	Hexane	70 ± 1	8	Hexane	58 ± 1
	EtOAc	75 ± 3		EtOAc	63 ± 5
	BuOH	76 ± 1		BuOH	68 ± 3
	H <sub>2</sub> O	75 ± 2		H <sub>2</sub> O	67 ± 4
3	Hexane	61 ± 5	9	Hexane	66 ± 5
	EtOAc	66 ± 3		EtOAc	66 ± 4
	BuOH	54 ± 2		BuOH	69 ± 5
	H <sub>2</sub> O	71 ± 4		H <sub>2</sub> O	71 ± 3
6	Hexane	53 ± 7	10	Hexane	64 ± 3
	EtOAc	60 ± 2		EtOAc	66 ± 3
	BuOH	61 ± 3		BuOH	69 ± 2
	H <sub>2</sub> O	71 ± 3		H <sub>2</sub> O	71 ± 4
7	Hexane	26 ± 4	11	Hexane	53 ± 5
	EtOAc	65 ± 5		EtOAc	70 ± 3
	BuOH	63 ± 1		BuOH	67 ± 3
	H <sub>2</sub> O	68 ± 2		H <sub>2</sub> O	68 ± 4
BHA		71 ± 2	Vitamin C		77 ± 1

<sup>z</sup>The final concentration of stock solution of each sample was 100 µg/ml.

<sup>y</sup>Each value is mean ± S.D. (n ≥ 3).

## 적 요

본 연구는 제주 자생 식물들의 항산화 활성을 측정함으로써 천연항산화 소재로의 활용 가능성이 있는 유망 자원을 발굴하고자 하였다. 제주도에서 자생하는 식물 11종을 대상으로 총 폴리페놀 화합물 함량 측정 및 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 기능이 좋은 식물 8종을 우선 선별하여 유기용매 분획을 실시하고 같은 실험을 농도별로 진행하여 가능성이 있는 유망 후보를 선별 하였다. DPPH free radical 소거 활성은 구실잣밤나무의 ethyl acetate 층과 애기달맞이의 buthanol 층에서 각각 IC<sub>50</sub> 값이 1.6 µg/ml, 2.4 µg/ml로 좋은 활성을 나타내었다. Nitric oxide 생성 저해 활성은 밤나무의 ethyl acetate 층에서 강한 저해율 보였다. Xanthine oxidase의 억제 효과는 밤나무의 ethyl acetate 층에서 IC<sub>50</sub> 값이 16 µg/ml로 우수한 활성을 나타내었다. Superoxide radical 소거 효과는 구실잣밤나무의 ethyl acetate 층에서 IC<sub>50</sub> 7 µg/ml로 좋은 활성을 나타내었고, hydroxyl radical 소거 활성은 구실잣밤나무의 buthanol 층에서 76%로 우수한 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 밤나무를 비롯한 항

산화 효과가 우수한 식물종에 대해 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항염증이나 항암, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 학술 및 산업적 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 사 사

이 논문은 2014학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

## References

- Azuma, K., M. Nakayama, M. Koshioka, M. Ippoushi, K. Yamaguchi, Y. Kohata, K. Yamauchi, Y. Ito H. and H. Higashio. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorusolitorius* L. J. Agric. Food Chem. 47:3963-3966.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26:1199-1200.
- Bu, H.J., H.H. Lee, E.S. Yoo, D.S. Jung, K.Z. Riu and S.J. Lee.

2004. Antioxidant effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of *Canaval ialineata*. Kor. J. Pharmacogn. 35(4):338-345 (in Korean).
- Chang, S.S., B.O. Matatijasevic, O.A.L. Hsieh and C.H. Hwang. 1977. Natural antioxidants rosemary and sage. J. Food Sci. 42:1102.
- Cheng, Z.J., S.C. Kuo, S.C. Chan, F.N. Ko and C.M. Teng. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. Biochem. Biophys. Acta. 1392:291-299.
- Choe, S.Y. and K.H. Yang. 1982. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and Butylated hydroxyanisole (BHA). Korea J. Food Sci. Technol. 14(3): 283-288 (in Korean).
- Chung, S.K., T. Osawa and S. Kawakishi. 1997. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard. Biosci. Biotech. Biochem. 61:118.
- Doh, E.S, J.P. Chang, K.J. Kil, M.S. Choi, J.K. Yang, C.W. Yun, S.M. Jeong, Y.H. Jung and G.H. Lee. 2011. Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L. extract. Korea J. Plant Res. 24(1):30-39 (in Korean).
- Ferrari, C.K.B., E.A.F.S. Torres. 2003. Biochemical pharmacology of functional food and prevention of chronic disease of aging. Biomed Pharn. 57:251-260.
- Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. Biochemistry 126: 131-136.
- Gutfinger, T.J. 1981. Polyphenols in olive oil. Am. Oil Chem. Soc. 58:966-968.
- Ham, S.S., S.Y. Lee, D.H. Oh, S.W. Jung, S.H. Kim, C.K. Chung and I.J. Kang. 1998. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. 27:745-750 (in Korean).
- Inkeda, N. and K. Fukuzume. 1977. Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. J. Japan Oil Chem. Soc. 26:343.
- Kato, H., I.E. Lee, N.V. Chyuen, S.B. Kim and F. Hayase. 1987. Inhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric. Biol. Chem. 51:1333-1338.
- Kim, S.M., Y.S. Cho and S.L. Sung. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extract. Kor. Soc. Food Sci. Technol. 33:626-632 (in Korean).
- Kim, N.K., J.H. Jung, K.J. Jang, I.Y. Ko, S.W. Choi and C.S. Yoon. 2005. Studies on the anti-oxidative effect of the buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) extract and its protective role against Cadmium-mediated stress. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 31(2):197-206 (in Korean).
- Schafer, E. and L. Arnrich. 1984. Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. J. Nutr. 144:1130.
- Lee, S.-E., J.H. Choi, J.H. Lee, H.J. Noh, G.S. Kim, J.K. Kim, H.Y. Chung and S.Y. Kim. 2013. Screening of useful plants with anti-inflammatory and antioxidant activity. Korean J. Plant Res. 26(4):441-449 (in Korean).
- Shon, M.Y., S.H. Kim, S.H. Nam, S.K. Park and N.J. Sung. 2004. Antioxidant activity of Korean green and fermented tea extracts. Journal Of Life Science 14(6):920-924 (in Korean).
- Ko, S.-Y. 2005. HPLC Analysis and, antioxidant effect of flavonoids extracted from citrus peels. Department of Chmestry, Master Thesis, Jeju National Univ., Korea. (in Korean).
- Yoshizawa S., T. Horiuchi, T. Yoshida and T. Okuda. 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. Phytother. Res. 1:44-47.

(Received 10 November 2014 ; Revised 19 January 2015 ; Accepted 13 April 2015)