



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

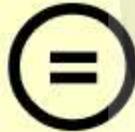
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주도 자생 식물들의
항산화 활성 검색



州大學校 教育大學院

化學教育專攻

張賢珠

2007年 8月

碩士學位論文

제주도 자생 식물들의
항산화 활성 검색



州大學校 教育大學院

化學教育專攻

張賢珠

2007年 8月

제주도 자생 식물들의 항산화 활성 검색

指導教授 李 璿 柱

張 賢 珠

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2007年 6月

張賢珠의 教育學 碩士學位 論文을 認定함

審査委員長 鄭 惠 商 印

委 員 李 璿 柱 印

委 員 金 原 亨 印

濟州大學校 教育大學院

2007年 8月

Screening for Antioxidant Activity of Jeju Native Plants

Hyun-Ju Jang

(Supervised by Professor Sun-Ju Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree
of Master of Education of Chemistry

2007 . 8 .

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Duck-Sang Jung of Education of Chemistry

(Name and signature)

MAJOR IN EDUCATION OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

장 현 주

제주대학교 교육대학원 화학교육전공

지도교수 이 선 주

본 연구는 제주도에서 자생하는 식물 11종(구실잣밤나무, 자주괴불주머니, 애기달맞이, 큰천남성, 광대나물, 밤나무, 산국, 약모밀, 산딸나무, 곰취, 떡썩)을 대상으로 총 폴리페놀 화합물 함량 측정 및 DPPH free radical 소거 활성 측정, nitric oxide 소거 활성 측정, xanthine oxidase 활성 억제 및 superoxide 소거 활성 측정과 hydroxy radical 소거 활성을 측정하여 항산화 기능이 좋은 식물 8종(구실잣밤나무, 애기달맞이, 밤나무, 산국, 약모밀, 산딸나무, 곰취, 떡썩)을 선별하였다. 이 8종에 대해 유기용매 분획을 실시하여 추출 분리한 뒤 각 분획물도 동일한 방법으로 항산화 활성을 조사하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 화합물 함량은 산딸나무의 methanol 추출물에서 283 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높게 나타났으며, 분획물의 경우 밤나무의 BuOH 층에서 712 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. DPPH free radical 소거 활성을 methanol 추출물에서 곰취의 methanol 추출물의 IC₅₀ 값이 8.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 좋은 활성을 보였고, 분획물은 구실잣밤나무의 EtOAc 층과 애기달맞이의 BuOH 층에서 각각 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군인 Vitamin C (2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 좋은 활성을 나타내었다. Nitric oxide 생성 저해 활성 실험에서 대조군 quercetin은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 77%의 보인대 반해 제주도 자생식물의 methanol 추출물들은 활성이 그다지 높지 않았다. 그 중 밤나무 methanol 추출물의 55%의 저해율을 보였고, 분획물의 경우 밤나무의 EtOAc 층에서 85%로 가장 높은 저해율을 보였다. Xanthine oxidase의 억제 효과를 측정한 결과 산딸나무의 methanol 추출물의 IC₅₀ 값이 59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 높은 활성을, 분획물의 경우 밤나무의 EtOAc 층에서 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군 allopurinol의 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 비교했을 때 우수한 활성을 나타내었다. Superoxide radical 소거 효과는 methanol 추출물에서 구실잣밤나무의 methanol 추출물의 IC₅₀ 값이 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 분획물은 EtOAc 층에서 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군인 allopurinol의 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 좋은 활성을 나타내었고, hydroxyl radical 소거 활성은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 methanol 추출물 중 밤나무 추출물이 74%, 분획물은 구실잣밤나무의 BuOH 층에서 76%로 대조군인 Vitamin C의 77%와 비교했을 때 우수한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이 결과들은 제주도 자생 식물 11종의 항산화능을 탐색한 것으로 이 중 8종을 이용한 항산화제 개발 가능성을 제시하고 있다. 밤나무를 비롯한 항산화 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.

* 본 논문은 2007년 8월 제주대학교 교육대학원 위원회에 제출된 교육학 석사학위 논문임.

목 차

국문초록	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 론	1
1. 연구배경	1
2. 연구동향	7
3. 연구목적	10
II. 재료 및 실험방법	10
1. 재료	10
1) 시료준비	10
2) methanol 추출물	11
3) methanol 추출물 용매분획 과정	11
2. 시약 및 기기	13
3. 총 폴리페놀 화합물의 함량분석	14
4. 항산화 실험	14
1) DPPH free radical 소거 활성 측정	14
2) Nitric oxide 생성 저해 활성 측정	15
3) Xanthine oxidase 억제 효과 및 Superoxide 소거 활성 측정	16
4) Hydroxy radical 소거 활성 측정	17
III. 실험결과 및 고찰	18
1. 총 폴리페놀 화합물 함량 분석	18
1-1 시료 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량 분석	18
1-2 시료 분획물의 총 폴리페놀 화합물 함량 분석	18

2. 항산화 실험	22
2-1 DPPH free radical 소거 활성 측정	22
1) 시료 추출물의 DPPH free radical 소거 활성 측정	22
2) 시료 분획물의 DPPH free radical 소거 활성 측정	24
2-2 Nitric oxide 생성 저해 활성 측정	27
1) 시료 추출물의 Nitric oxide 생성 저해 활성 측정	27
2) 시료 분획물의 Nitric oxide 생성 저해 활성 측정	29
2-3 Xanthine oxidase 억제 효과 측정	32
1) 시료 추출물의 Xanthine oxidase 억제 효과 측정	32
2) 시료 분획물의 Xanthine oxidase 억제 효과 측정	34
2-4 Superoxide 소거 활성 측정	37
1) 시료 추출물의 Superoxide 소거 활성 측정	37
2) 시료 분획물의 Superoxide 소거 활성 측정	39
2-5 Hydroxy radical 소거 활성 측정	42
1) 시료 추출물의 Hydroxy radical 소거 활성 측정	42
2) 시료 분획물의 Hydroxy radical 소거 활성 측정	44
IV. 결 론	47
V. 참 고 문 헌	51
VI. 부 록	57
ABSTRACT	67

List of Tables

Table 1. The Involvement of Free radical in Diseases.	4
Table 2. Contents of total polyphenols in methanol extracts of Jeju plants.	19
Table 3. Contents of total polyphenols in solvent extracts of Jeju plants.	20
Table 4. DPPH free radical scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.	23
Table 5. DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	25
Table 6. Nitric oxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.	28
Table 7. Nitric oxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	30
Table 8. Xanthine oxidase inhibition activities of methanol extracts of Jeju plants.	33
Table 9. Xanthine oxidase inhibition activities of solvent extracts of Jeju plants.	35
Table 10. Superoxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.	38
Table 11. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	40
Table 12. Hydroxyl radical scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.	43
Table 13. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	45

List of Figures

Figure 1. The Generation of Free Radical by Environmental Facts	3
Figure 2. Removal of oxygen and nitrogen free radicals and other reactive species in mammalian cells	5
Figure 3. Production of oxygen and nitrogen free radicals and other reactive species in mammalian cells	6
Figure 4. Fractionation scheme of methanol extract of each sample.	12
Figure 5. Contents of total polyphenols in methanol extracts of Jeju plants.	21
Figure 6. Contents of total polyphenols in solvent extracts of Jeju plants.	21
Figure 7. DPPH radical scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants.	26
Figure 8. DPPH radical scavenging activity of solvent extracts of Jeju plants.	26
Figure 9. Nitric oxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.	31
Figure 10. Nitric oxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	31
Figure 11. Xanthine oxidase inhibition activities of methanol extract of Jeju plants.	36
Figure 12. Xanthine oxidase inhibition activities of solvent extracts of Jeju plants.	36
Figure 13. Superoxide scavenging activities of methanol extract of Jeju plants.	41
Figure 14. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of	

Jeju plants.	41
Figure 15. Hydroxyl radical scavenging activities of methanol extract of Jeju plants.	46
Figure 16. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.	46
Figure 17. The leaves and stems of <i>Castaonpsis cuspidata</i> var.	57
Figure 18. The leaves and stems of <i>Corydalis Incisa Pers.</i>	58
Figure 19. The leaves and stems of <i>Oenothera laciniata.</i>	59
Figure 20. The leaves and stems of <i>Arisaema ringens.</i>	60
Figure 21. The leaves and flower of <i>Lamium amplexicaule.</i>	61
Figure 22. The leaves and flower of <i>Castanea crenata</i> var.	62
Figure 23. The leaves and flower of <i>Chrysanthemum boreale.</i>	63
Figure 24. The leaves and flower of <i>Houttynia cordata.</i>	63
Figure 25. The leaves and flower of <i>Cornus kousa.</i>	64
Figure 26. The leaves and flower of <i>Ligularia fiacheri.</i>	65
Figure 27. The leaves and flower of <i>Gnaphalium affine.</i>	66

I. 서론

1. 연구 배경

최근 생활수준이 급속하게 향상됨에 따라 개인 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며, 국가적으로 풍요로움과 건강사회가 구현되는 복지사회국가를 건설하고자 하는 것이 중요 목표가 되고 있다.¹⁾ 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.^{2~5)} 그 중에서도 고혈압, 암, 뇌졸중, 당뇨 등의 치료제를 찾아내기 위해 체계적이고 장기적인 시도가 진행되고 있으며, 항노화, 항산화, 미백, 항암, 항균 효능 등의 기능성을 탐색하는 연구⁶⁾에 대한 관심 역시 높아지고 있다.

근래 경제 개발로 인해 지구 환경이 지속적으로 파괴됨에 따라 많은 문제들이 표면화되고 있다.⁷⁾ 특히 오존층의 파괴로 자외선의 조사량이 증가하고 있는데, 이는 피부에 다양한 생화학적 반응을 일으켜 피부 내에 활성산소종의 발생을 증가시키고, 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어 체계의 불균형을 초래하여⁸⁾ 각종 피부암을 유발하고 면역 체계 파괴로 저항력 약화 등 건강에 많은 피해를 주고 있다.⁹⁾

인간을 비롯한 모든 생명체들은 생존과 활동에 필요한 에너지(ATP)를 공급받기 위해 필연적으로 탄수화물과 지방의 대사에 의존하게 된다. 이러한 열량소들이 에너지를 생산하기 위해서는 산소의 공급이 필수적이며,¹⁰⁾ 이 때 공급된 산소는 세포내 미토콘드리아의 대사과정에 이용되고, 그 중 약 2% 정도가 우리 몸에 해가 되는 산소 화합물인¹⁰⁾ 유해산소 또는 활성산소라고 부르는 free radical로 변하게 된다(손장락, 2004).

활성산소란 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 산소원자나 분자를 의미한다. 이들은 매우 불안정하여 이 쌍을 이루고 있지 않는 전자를 잃거나 혹은 주위로

손장락. 활성산소와 항산화제 (생노명사의 열쇠, Free radical & antioxidant) 바이오메니컬, 2004

부터 전자 하나를 얻어, 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있다. 이 때 주위의 화합물로부터 쉽게 전자의 주고받음이 일어나기 때문에 이들은 높은 반응성을 나타낸다. 분자 내 활성산소를 가지는 reactive oxygen species(ROS)에는 1O_2 , H_2O_2 와 같은 비라디칼종과 O_2^- , $\cdot OH$ 과 같은 산소중심의 라디칼들, 그리고 생체 성분과 ROS와 반응에서 유리된 $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등이 포함된다.^{11,12)} 하지만 생체에는 계속해서 생기는 활성 산소종들을 제거하는 항산화효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화제(tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)들로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에서 세포 기능을 유지하고 있다.¹³⁾ 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 계속해서 일어나고 있으며 이러한 반응은 Table 1에 나타내었다. 계속된 산화적 스트레스는 생체 내에서 과잉의 ROS를 생성하고, 이는 돌연변이, 세포살상, 발암과 노화뿐만 아니라 노화와 관련된 다양한 퇴행성 질환들을 나타나게 한다. 또한 지질 과산화, 단백질 산화, 세포간질 성분을 파괴시키는 단백질 분해효소의 활성화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히알루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다.⁷⁾ 특히 생체막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 과산화 지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ Table 1에는 활성산소로 인해 야기되는 질병들을 나타내었다. 따라서 이러한 질병들을 지연시키고 억제하기 위해 피부와 생체내에서 과잉으로 생성되는 활성 산소종의 생성을 억제하고 활성 산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다.

체내에서 유리 radical이 생성되는 mechanism은 Figure 2과 Figure 3에 나타내었다. Nitric oxide(NO)는 L-arginine으로부터 NO synthase에 의해 생성된다. Superoxide anion(O_2^-)은 Figure 2에 나타난 것처럼 다양한 대사경로를 통하여 체내에서 생성된다. 그 대사경로를 살펴보면 다음과 같다. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(NADPH)에 의한 NADPH의 산화과정이나, 미토콘

드리아의 전자전달계에서 발생하는 NADPH, flavin adeninedinucleotide(FADH₂)의 산화과정, 또는 Xanthine oxidase에 의한 xanthine 혹은 hypoxanthine의 산화과정 및 전이 금속 존재 시 monamin, flavin, hemoglobin의 자동산화과정에서 생성되거나, cytochrome P-450에서의 생성되는 경우가 있으며, arginine 혹은 tetrahydrobiopterin 부족시 O₂ 분자로부터 NO synthase에 의해서 생성되어진다.¹⁵⁾

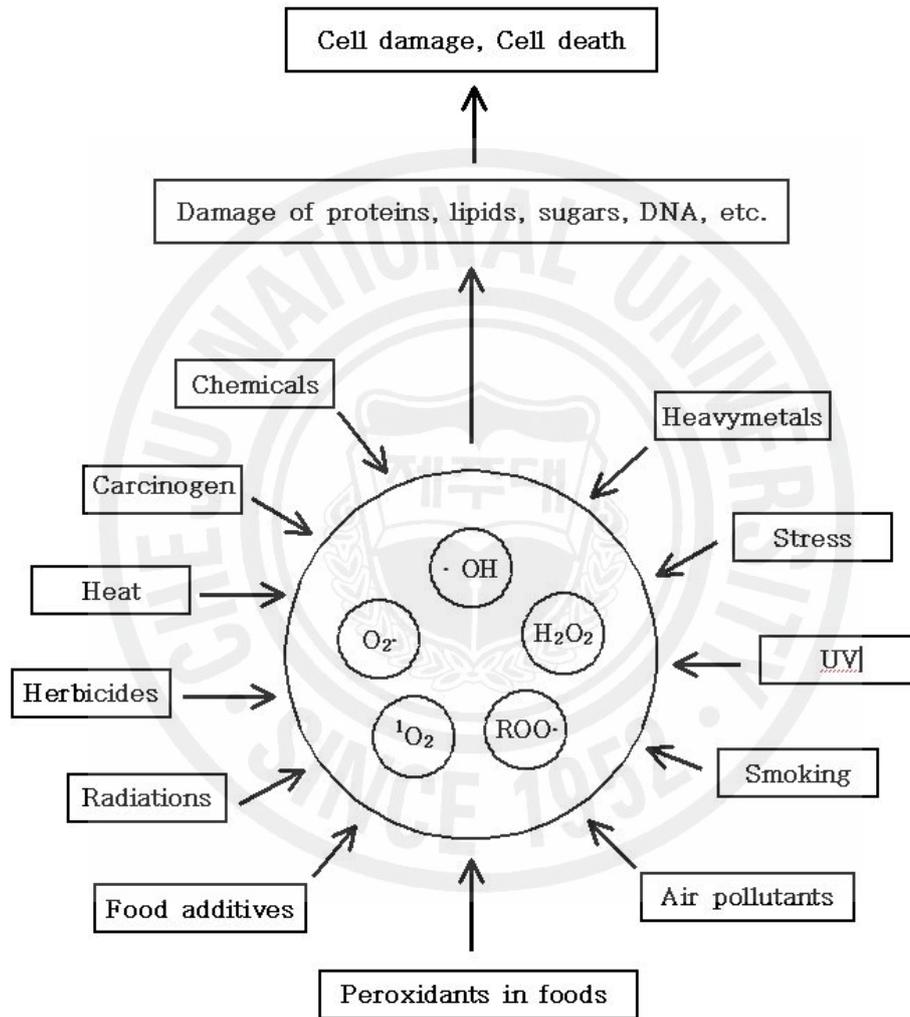


Figure 1. Free radical generated by Environmental sources.

박영미 : Study on screening of antioxidant substance from natural products.
건국대학교 농축대학원 석사학위논문 (2000)

Inflaromabory	SO2 toxicity, Paraquat toxicity
Glomerulonephrits (idopathic, membranous)	Heartand cardiovascular system
Vasculitis (hepatitis B virus, drugs)	Alcohol cardiomyopathy
Autoimmune diseases, Aheumatoid artheits	Kesham disease (seleriurm deficiency)
Ischemia-revlow states	Atherosclerosis
Strodeimyelocardial infarctioniarrhythmias	Adriamycin cardiotoxicity
Organ rtansplantation,	Kidney
Frostbite, Dupuytren's contracturel	Autoimmune mephrotic syndromes
Dysbaric osteonecrosis	Aminoglyciside nephroboxicity
Iron overload	Heavy metal nephrotoxicity (Pb, Cd, Hg)
Idopathic haemochromatitits	Gastrointestinal tract, Endotoxic liver injury
Dietary iron overload (Bantu)	Halogenated hydrocarbon liver injury
Thalassemia and other chronic anemias	Diabetogenic action of alloxan
treated with multiple bolld transfusions	Pancreatitis
Nutritional deficiencies (Kwashiorkor)	NSAID-incuced gastrointestinal tract lesions
Alcobolism	Oral iron poising
Alcohol-induced iron overload	Brain/neryous system
Alcohol myopathy	/veuromuscular disorders
Radiation injury	Hyperbaric oxygen, Vitamin E deficiency
Nuclearexplosions, Accidental exposure	Neurotoxins, including lead
Fladotherapy, Hypoxic cell sensitizers	Parkinson's disease
Aging	Neuronal cerebr ovascular injury
Disorders of premature aging	Hypertensive cerbr ovascular injury
Red blood cells, Phenylhydrazine	Allergic incephalomyelitis and other
Primaquine, reated drugs	demyilinating diseasesase
Lead poisoning	Aluminum overload (Alzheimer's disease)
Protopor phyrin photooxidation	Potentialtion of traumatic injury
Malaria	Muscular dystrophy
Stickle cell anemia multiple sclerosis	Eye, Cataractogenesis
Favism, Fancini's anemia	Ocular hemorrhage
Hemolytic anemia of primaturity	Dehenerative retinal damage
Lung	Retinopathy (retroental of prematurity
Euphysima, Cigaritte smoke effects	fibroplasia), Photic retinopathy
Bronchopulmonary dysplasia	Skin
Adult respiaatory distress syndrome	Solar radiation, Thermal injury
Mineral dust pneumocomiosis	Porphyria
Ashestos carcinogenicity	Hypericin, other photosensitizers
Bleomycin boxicity	Comatact dermatitis

Table 1. Free radical are involved in many diseases.

박영미 : Study on screening of antioxidant substance from natural products.
 건국대학교 농축대학원 석사학위논문 (2000)

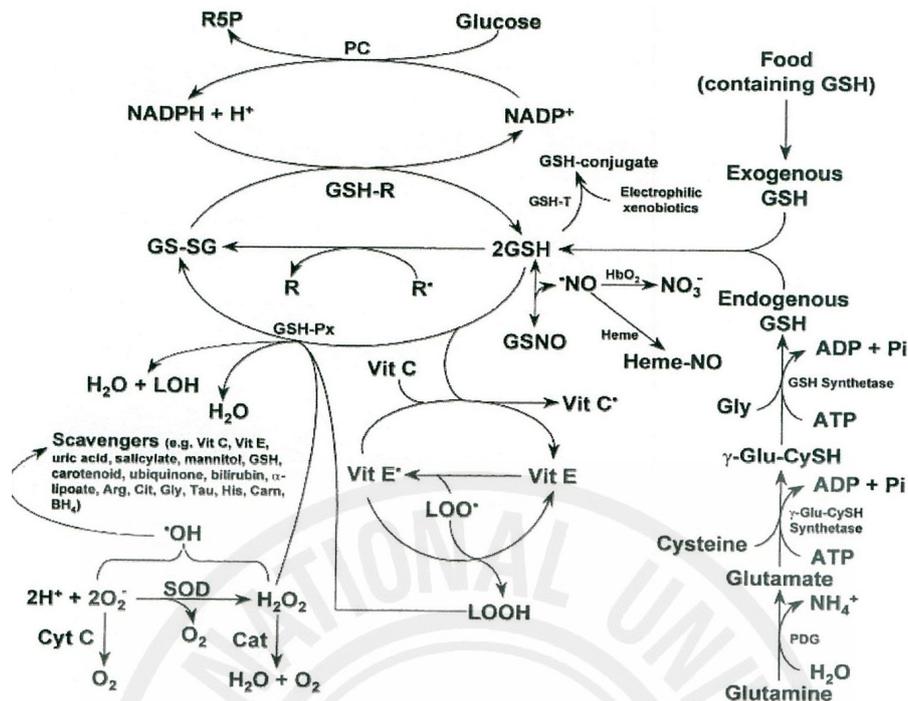


Figure 2. Removal of oxygen and nitrogen free radicals and other reactive species in mammalian cells.

ADP, adenosine diphosphate; Arg, L-arginine; BT4, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin; Carn, carnosine; CAT, catalase; Cit, citrulline; Cyt C cytochrome C; Glu, L-glutamate; Gly, glycine; γ -Glu-CySH, γ -glutamyl-cysteine; GS-SG, oxidized glutathione (glutathione disulfide); GSH, glutathione(reduced form); GSH -Px, glutathione thione peroxidase; GSH-R, glutathione reductase; GSH-T, glutathione S-transferase; GSNO, nitrosylated glutathione; HbO, oxyhemoglobin; Hemo-NO, hemo-nitric oxide; His, histidine; H₂O₂ hydrogen peroxide; LOH, lipid alcohol; LOO·, lipid peroxy radical; LOOH, lipid hydroperoxide; NADP+, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized); NADPH, nicotinamide adenine phosphate (reduced); ·NO, nitric oxide; NO₃⁻, nitrate; O₂⁻, superoxide anion radical; ·OH, hydroxy radical; PC, Pentose cycle; R·, radicals; R, none-radicals; R5P, ribulose-5-phosphate; SOD, superoxide dismutase; Tar, taurine; Vit C·, vitamine C radical; Vit E·, vitamine E radical.

Fang Y. Z., Yang S., Wu G. : Free radical, antioxidant and nutrition. *Nutrition* 12 : 872-879 (2002)

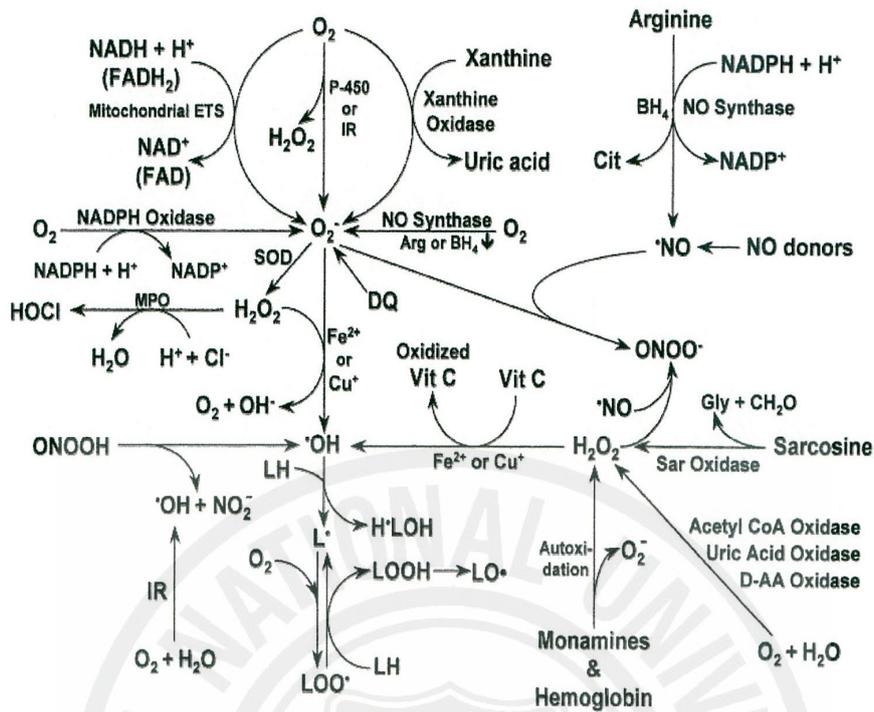


Figure 3. Production of oxygen and nitrogen free radicals and other reactive species in mammalian cells.

AA, amino acid; Arg, L-arginine; CH₂O, formaldehyde; Cit, citrulline; DQ, diquat; ETS, electron transport system; FAD, flavin adenine dinucleotide (oxidized); FADH₂, flavin adenine dinucleotide (reduced); Gly, glycine; H₂O₂, hydrogen peroxide; HOCl, hydrochlorous acid, LOH, lipid alcohol; IR, ionizing radiation; L·, lipid radical; LH, lipid (unsaturated fatty acid); LO·, lipid alkoxy radical; LOO·, lipid peroxy radical; LOOH, lipid hydroperoxide; MPO, myeloperoxidase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced); NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized); NADPH, nicotinamide adenine phosphate (reduced); ·NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide anion radical; ·OH, hydroxy radical; ONOO⁻, peroxyntirite; P-450, cytochrome P-450; Sar, sarcosine; SOD, superoxide dismutase; Vit C·, vitamine C radical.

Fang Y. Z., Yang S., Wu G. : Free radical, antioxidant and nutrition. *Nutrition* 12 : 872-879 (2002)

2. 연구동향

항산화제(antioxidant)란 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화 억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소로 free radical의 독성을 억제할 뿐만 아니라(김영곤, 2004) 유지의 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 요인들을 일컫는다. 또한 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하기도 한다.¹⁶⁾ 이런 항산화제의 작용은 자동산화의 유도기에서 free radical이나 peroxy radical에서 hydroperoxide를 생성하는 속도를 효과적으로 억제하고 안정한 화합물로 전환시킴으로써 산화를 억제할 수 있다.

Free radical의 연쇄 반응을 정지시키는 물질은 phenol성의 화합물로서 유지의 자동산화의 생성물인 peroxy radical에서 hydrogen radical을 제공하여 안정한 화합물로 전환시키므로 free radical의 연쇄반응을 억제한다. 이때 항산화제는 free radical이 되지만 비교적 안정한 phenol의 공명구조를 가지게 되고, 산화에 이르기까지 유도기를 연장시키는 작용을 한다. 또한 peroxy radical을 생성하기 전에, 즉 기질이 탈수소되어 free radical이 생성되는데 생성된 free radical에 항산화제가 hydrogen radical을 제공함으로써 radical 연쇄반응을 억제한다.¹⁵⁾ 이러한 phenol성의 화합물은 여러 식물류에 널리 분포하며, 천연물 중에서 amino acid, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, melanodin, 각종 효소류, tocopherol 등 항산화 작용을 가지고 있는 여러 종류의 물질들이 존재하고 있는데, 이들 중에서 phenol 성분들이 강한 산화 방지작용을 지니고 있다. 식물과 식품 등에 널리 존재하는 polyphenol 물질들은 식물체 및 인체의 항산화 효과 및 방어기작 등 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 보통 phenol 화합물은 한 개 또는 두 개 이상의 수산기로 치환된 방향족 고리를 가지고 있는 물질로서, phenolic acid 및 coumarin류, flavonoid류, tannin류로 나누며, 그 구조에 따라 화학적 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다. 이러한 phenol 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응 시 기질로 작용하며, 미생

김영곤. 항산화제 (Antioxidants). 여문각. 2004

물의 공격을 막아 식물 자체를 보호하는 동시에 식품 등에서 짙은 맛, 쓴맛과 같은 식물성 식품의 고유한 맛에 관계한다.¹⁾

항산화제의 종류는 크게 효소계와 비효소계로 분류할 수 있는데 이는 유전인자에 의해 생성되는 단백질 효소와 화학물질의 차이로 구분된다. 호기성 생물은 다양한 전자 전달 부위에서 이탈 또는 자가산화 반응을 통해 생성되는 산소 라디칼에 대한 방어기작을 가지고 있기 때문에 산소 라디칼을 생성하는 여러 인자와 세포를 방어하기 위한 물질들 사이의 균형을 유지하기 위해 primary antioxidant, secondary antioxidant, enzymatic antioxidant 등 세 그룹으로 분류할 수 있다. Primary antioxidant는 직접 유리 radical과 반응하여 안정화된 화합물을 생산하는 대신 자신은 공명에 의해서 안정화된다. 즉 활성이 상대적으로 낮은 radical이 된 후 다시 다른 항산화제 radical과의 상호 작용에 의해서 radical이 아닌 안정한 화합물이 된다. 그 종류에는 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), propyl gallate (PG) 등이 있으며 천연 항산화제에는 vitamin E 및 carotinoid 등이 있다. 서술한 바와 같이 천연에는 많은 종류의 항산화제가 존재하며(김광수 외, 2004) 동·식물에 널리 분포되어 있다.¹⁷⁾ 비타민 A, C 및 E는 미량 영양소일 뿐 만 아니라 주된 항산화제로 체내의 free radical의 작용을 억제하는데 매우 중요한 역할을 한다. 비타민 A는 화학적으로 비타민 E와 같이 산화되기 쉬운 성질이 있어 자신이 항산화 작용을 가지며 매우 활성적인 singlet oxygen을 포획하여 free radical로 유도되는 반응을 방어할 수 있으며, 이에 관한 많은 연구가 시도되었다.^{18~20)} 비타민 C는 수용성 항산화제로 산소제거제나 수소공여체로 작용하여 superoxide나 hydroxyl radical과 빠르게 반응하고 다른 free radical을 환원시킴으로써 산화된 flavonoids를 환원시켜 phenolic 항산화제와 시너지로 작용한다. 또한 조직의 산화적인 손상을 방어하는데 효과적이며 발암물질을 억제하는 작용을 한다고 보고되었다.^{21~23)} 비타민 E는 singlet oxygen과 반응하며 생체막에서 peroxy radical이나 alkoxy radical과 반응하여 수소원자를 제공함으로써 지질과산화의 연쇄반응을 종결시키거나 막 속의 인지질과 황을 함유한 단백질과 결합하여 막 구조와 세포막의 안정 유지를 돕고 막 손상과 막 조직에 있는 고도

김광수 외 5인 공저. 식품화학의 이해. 월드 사이언스. 2004

불포화지방산의 산화를 방지하여 세포기능을 정상적으로 유지시키는 역할을 한다.²⁴⁾ Secondary antioxidant는 산화를 촉진시키는 금속이온을 제거하거나 primary antioxidant radical에 다시 수소를 건네주는 작용을 한다. 또한 singlet oxygen과 반응하여 활성산소를 제거하거나 UV를 흡수하여 산화를 억제한다. 금속이온제거 효과를 나타내는 물질로는 citric acid, phytic acid, ethylene diamine tetacetic acid(EDTA)등이 존재한다. 만일 프리라디칼을 만들 소지가 있는 금속이온을 사전에 미리 흡착시켜 버리는 물질이 있으면 프리라디칼 반응이 줄어들 수 있을 것이다. 세포 내의 금속이온 농도를 줄여 주는 흡착제 사용하여 프리라디칼 생성반응이 줄어든다. 흡착제 기능을 하는 대표적인 물질이 phytic acid이며 곡류에 풍부히 들어 있다. 최근 미국에는 chelation 치료센터라는 것이 있으며, 몸 안에서 프리라디칼을 만드는 철분 등의 광물질들을 흡착시켜 제거해 주는 치료법이 이용되기도 한다.⁶⁵⁾ 마지막으로 Enzymatic antioxidant는 체내물질의 유리 radical에 의한 손상을 방지하는데 중요한 역할을 하며 그 종류로서 Hydrogen peroxidase, SOD, catalase 등이 생체 내에 존재한다.¹⁵⁾²⁵⁾ SOD들은 세포 안에서 세포를 지키는 항산화제로 여러 종류가 존재하며, SOD가 제대로 항산화작용을 하기 위해 철이나 구리, 아연같은 금속이온이 필요하고, 어떤 금속이온을 갖고 있느냐에 따라 작용 부위가 조금씩 다르다. 즉 어떤 SOD는 미토콘드리아내에서 생긴 프리라디칼을 제거하고, 다른 SOD는 세포질의 내형질 망에서 생긴 프리라디칼을 제거한다. 또 일부 SOD는 세포내의 핵 속과 폐록시좀 소기관에도 존재하여 여기서 생기는 프리라디칼을 제거하는 일을 하는 것이다. Catalase라고 하는 물질이 과산화수소를 제거하는 세포방어 물질로서, 과산화수소를 물과 산소로 분해시킨다. SOD와 catalase는 서로 균형을 이루면서 상호 협력하고 있으며, 이 균형이 깨져 과산화수소를 제거하는 catalase에 비해 과산화수소를 만드는 SOD작용이 더 크면 세포 손상이 커진다. 또 이들 간의 불균형이 생기면 여러 질병들이 초래된다.⁶⁵⁾

3. 연구목적

현재 상용되고 있는 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)와 BHA(butylated hydroxyanisole)는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취시 심각한 여러 질병을 유발 시킬 수 있다고 한다.^{26,27)} 또한 합성 항산화제는 이취(異臭)가 있고 고온에서 불안정하며,^{28,29)} 기형 발생인자 발암물질이 될 수 있고,³⁰⁾ 특히 합성 항산화제의 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성 작용을 일으키는 것으로도 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 생체 부작용이 없고 활성 산소를 제거하여 질병예방 및 노화억제에 효과가 있으며, 항산화력이 강한 천연 항산화제를 동·식물로부터 찾으려는 연구가 더욱 활발히 진행되어야 할 것이다.³¹⁾

본 연구에서는 제주도에서 자생하는 식물 11종(구실갯밤나무(수피), 자주괴불주머니, 애기달맞이(지상부), 큰천남성(지상부), 광대나물, 밤나무, 산국, 약모밀, 산딸나무, 곰취, 떡쑥)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 측정하여 항산화 기능이 좋은 식물 8종에 대하여 유기용매 분획을 이용하여 추출 분리하고 각 분획별로 항산화 활성을 조사하여 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

1) 시료준비

본 연구에서 사용한 구실갯밤나무는 2006년 5월에 제주대학교 근처에서 채집하였으며 수피를 이용하여 실험에 임하였고, H-1로 labeling 하였으며, 2006년

5월 제주대학교 근처에서 채집한 자주괴불주머니의 전초를 H-2로 labeling 하여 실험에 임하였다. 애기달맞이는 2005년 8월에 함덕 해수욕장 근처에서 채집한 것의 지상부를 H-3로 labeling 하여 실험에 임하였고, 2006년 5월에 조천읍 선흘리 근처에서 채집한 큰참남성의 지상부를 H-4로 labeling 하여 실험에 이용하였다. 광대나물은 2006년 3월 제주대학교 근처에서 채집한 전초를 H-5로 labeling 하여 실험에 이용하였고, 2005년 11월 제주대학교 근처에서 채집한 밤나무의 잎을 H-6로 labeling 하여 실험에 사용하였으며, 2006년 5월에 오라동 근처에서 채집한 산국의 꽃을 H-7로 labeling 하여 실험에 임하였다. 약모밀의 전초를 2006년 6월에 제주대학교 근처에서 채집하여 H-8로 labeling 하였고, 2006년 6월 제주대학교 근처에서 채집한 산딸나무의 잎을 H-9으로, 2006년 6월에 제주대학교 근처에서 채집한 곰취의 전초를 H-10로, 2005년 5월에 제주대학교 근처에서 채집한 떡쑥의 전초를 H-11로 labeling 하여 실험에 사용하였다.

2) Methanol 추출물

채취한 제주 자생식물 11종을 음지에서 통풍건조 하였다. 건조된 시료를 잘게 파쇄하여 미세 분말로 만든 후, 추출용매인 80% methanol에 한 달 동안 침지하여 추출하였다. 추출액을 필터로 여과하여 고형물을 분리하고 methanol 추출액을 감압농축기를 이용하여 농축하였으며, 완전히 농축된 상태의 시료를 얻기 위하여 동결 건조기를 이용하고 잔여 수분을 제거한 뒤 최종적으로 분말 시료를 얻었다. 추출한 methanol 추출물들은 모두 항산화 활성의 비교 검색에 사용하기 위해 모든 시료를 동일한 농도가 되도록 조절하였다. 즉, 각각의 추출물을 일정량씩 취한 뒤 시료별 HPLC 급 methanol로 정확히 용해한 후 최종 농도가 100 mg/mL이 되도록 제조하여 4℃에서 냉장보관하며 각 실험에 사용하였다.

3) Methanol 추출물 용매분획 과정

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(H-1, H-3, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11)의 식물 종에 대해 유기 용매 분획을 실시하여 추출 분리하였다. 획득한 각각의 methanol (MeOH) 추출물을 일정량의 물에 현탁 시킨 후, 분획깔때기를 이용하여 극성이 다른, 즉 비극성 용매인 n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH)을 순차적으로 이용하여 용매분획 하였다. 먼저 분획깔때기에 n-hexane을 증류수와 동량으로 넣고, 잘 혼합한 후 수층과 추출 용매의 두 층으로 나뉘도록 방치하였다. 추출 용매를 분리하고 남은 여액을 같은 방법으로 ethyl acetate와 butanol을 남은 여액과 동량으로 넣고 차례대로 각각 추출한다. 추출 여액을 감압 농축하여 각각의 분획물을 얻었으며 동일한 농도가 되도록 조제하여 4℃에서 냉장보관하며 각 실험에 사용하였다. (Figure 4)

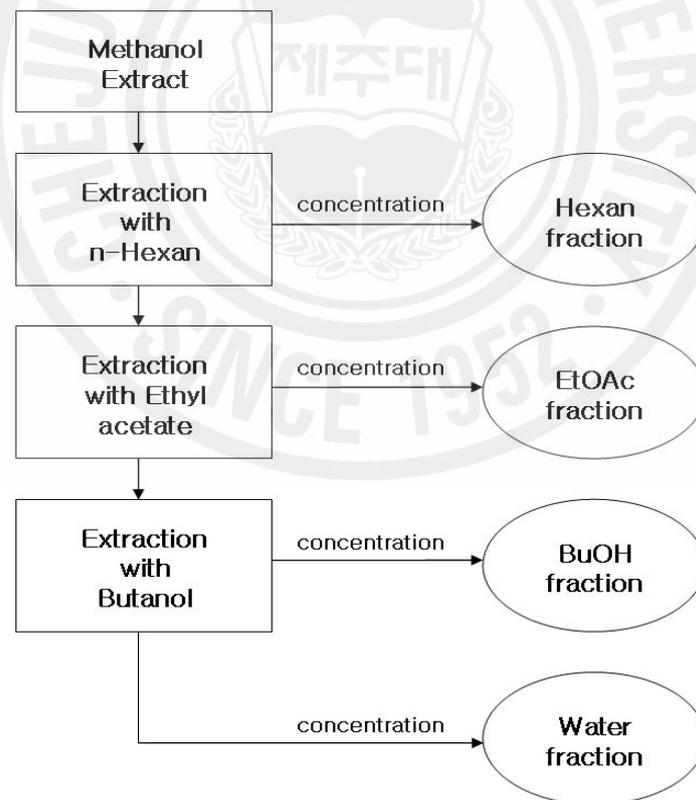


Figure 4. Fractionation scheme of methanol extract of each sample

2. 시약 및 기기

1) 시약

본 실험에서 시료의 추출, 분획에 사용된 용매들은 Merck Co. (USA), Junsei Co. (JAPAN), Hyman Co. 사의 제품을 사용하였다. 폴리페놀 화합물 함량을 측정하기 위해 사용한 Folin-denis reagent는 Fluca 제품이 사용되었으며, Sodium Carbonate와 tannic acid는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. DPPH free radical 소거 활성을 측정하기 위해 사용된 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)와 대조군으로 사용된 L-ascobic acid, BHA(butylated hydroxy anisole) 등, nitric oxide 생성 저해 활성을 측정하기 위해 사용한 NED(N-(1-naphthyl)-ethylenediamide dihydrochloride), Quercetin, SNP(sodium nitroprosside), Sulfanilamide, Phosphoric acid(H_3PO_4)와 xanthine oxidase와 superoxide 소거 활성 측정에 사용된 allopurinol, EDTA, NBT(nitroblue tetrazolium chloride), Sodium Phosphate(NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4) SOD(Superoxide dismutase), Xanthine, xanthine oxidase 등, 그리고 hydroxyl radical 소거활성을 측정하기 위해 사용된 2-deoxyribose, TBA(thiobarbituric acid), TBC(trichloroacetic acid) 등도 Sigma사(USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

2) 기기

본 실험에서 시료의 무게를 재기 위해 Aventura의 ITEM NO. AR 2140을 이용하였고, 시료를 동결 건조 하기 위해 MAXI dry Iyo 제품을 사용하였다. 시료를 농축시킬 때 이용한 evaporator는 EYELA 제품을 사용하였으며, 시료를 반응시킬 때 이용한 incubator와 water Bath는 HANBAEK SCIENTIFIC. CO. 사의 제품을 사용하였고, multichannel-pipette은 GILSON의 제품을 이용하였다. 그리고 시료의 흡광도를 측정하기 위해 이용한 ELISA reader는 Thermo Electron lab systems Multiskan EX의 제품을 이용하였으며, UV/VIS spectrometer는 KNAVER u-Quant 제품을 사용하여 실험에 임하였다.

3. 총 폴리페놀 화합물의 함량분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형하여 실시하였다.³⁶⁾ 먼저 tannic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 tannic acid 1mg을 50% methanol 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 최종농도가 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 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 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 1 M Na_2CO_3 용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고, 증류수 1.4 mL를 가하여 total volume이 4 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 앞에서 작성한 표준곡선으로부터 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4. 항산화 실험

1) DPPH free radical 소거 활성 측정

DPPH는 산화제로 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 515 nm ~ 520 nm에서 특징적인 흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 보라색이 탈색되며, 탈색되는 정도로 항산화 물질의 활성을 측정할 수 있다.³⁷⁾ 이 실험은 DPPH로 먼저 산화를 개시한 후 sample에 의해서 radical에 대한 소거 활성 측정 능력을 알아보기 위한 실험이다.

각 시료 추출물의 전자공여능(electron donating ability, EDA %) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다.³⁸⁾ 각 시료 추

출물을 methanol에 녹여 여러 농도로 준비한 뒤, 96 well plate에 100 μ l씩 분주하고, ethanol에 녹인 0.4 mM DPPH를 동량 첨가하여 실온의 암실에서 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. 반응 혼합물의 흡광도가 낮을수록 높은 free radical scavenging activity를 나타낸다.³⁹⁾ DPPH free radical 소거활성은 다음 식으로부터 산출하여 전자공여능(EDA %)에 의한 환원력으로 항산화능을 표시하였고,⁴⁰⁾ 항산화능을 비교 검토하기 위해서 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)를 구하여 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical 소거활성 (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A_{sample} = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

A_{control} = 시료 대신 methanol을 첨가한 반응액의 흡광도

2) Nitric oxide 생성 저해 활성 측정

아질산염 소거능 측정(nitrite scavenging ability)은 Kato 등⁴¹⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. 자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거 활성을 검색하였다.^{42,43)} PBS (pH6.8)에 희석한 여러 농도의 시료 각각을 96 well plate에 50 μ l씩 분주하고, 10 mM SNP 용액을 50 μ l 첨가하여 실온의 25 $^{\circ}$ 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 것으로, 사용직전에 조제]을 100 μ l씩 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 (IC₅₀)를 이용하여 nitric

oxide 소거활성을 표시하였다.

$$\text{Nitric oxide 소거활성 (\%)} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample} = 시료 첨가구의 흡광도

A_{control} = 무첨가구의 흡광도

3) 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.^{44,45)} 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 μ l씩 분주한 뒤, 위 반응 용액을 50 μ l 첨가하였다. 이 때 enzyme으로 50 mU/mL xanthine oxidase를 100 μ l씩 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였으며, 반응 혼합 용액을 37 $^{\circ}$ 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(IC₅₀)를 이용하여 저해 활성을 표시하였다.

$$\text{Xanthine oxidase 소거활성 (\%)} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample} = 시료 첨가구의 흡광도

A_{control} = 무첨가구의 흡광도

4) Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical은 과산화수소와 2가의 철염(Fe^{2+})을 첨가하는 Fenton 반응에 의해 생성된다.⁴⁶⁾ Hydroxyl radical은 불안정하기 때문에 Chung 등^{47,48)}의 방법을 이용하여 Hydroxyl radical에 의해 deoxyribose의 분해산물인 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)의 양을 측정하였다. Hydroxyl radical은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 존재하에 생성시켰으며, 각 시료 추출물 200 μl 에 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 용액 200 μl 와 10 mM EDTA 용액 200 μl , 10 mM 2-deoxyribose 용액 200 μl 를 첨가하여 잘 혼합한 후, 0.1 M phosphate buffer 용액(pH 7.4) 1 mL을 가하여 total volume이 1.8 mL이 되도록 희석하였다. 이 반응용액에 10 mM H_2O_2 200 μl 를 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응을 진행시켰다. 여기에 2.8% trichloroacetic acid 1 mL을 넣고 반응을 시키고 1% thiobarbituric acid 1 mL을 첨가하여 100°C에서 10분간 발색시킨 후 얼음 속에서 급속히 냉각하여 UV-Visible spectrophotometer로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성정도는 다음 식을 이용하여 deoxyribose 분해 저해도를 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거활성 (\%)} = (1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample} = 시료 첨가구의 흡광도

A_{control} = 무첨가구의 흡광도

III. 실험결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 화합물 함량 분석

1-1. 시료 추출물의 총 폴리페놀 화합물 함량 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.⁴⁹⁾ 본 실험에서는 tannic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하고, 제주도에서 자생하고 있는 식물 11종의 methanol 추출물을 가지고 phenolic 화합물의 함량을 측정하였으며, 분석한 결과는 Table 2, Figure 5와 같다.

결과에서 보는 바와 같이 총 폴리페놀 화합물 함량은 H-9 추출물에서 283 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높게 나타났으며, H-1 (278 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > H-6 (92 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > H-11 (89 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > H-3 (58 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > H-10 (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > H-8 (19 $\mu\text{g}/\text{mg}$) > 순으로 나타났고, H-7, H-2, H-4, H-5 에서는 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이하로 매우 낮은 함량을 확인할 수 있었다.

1-2. 시료 분획물의 총 폴리페놀 화합물 함량 분석

Crude methanol extracts 11종에 대해 폴리페놀 함량과 5가지 항산화 실험을 수행한 결과 기능이 좋은 식물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하여 추출 분리하여 분획물을 얻었으며, 시료 분획물의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 3, figure 6과 같다.

시료 분획물의 총 폴리페놀 함량 분석 결과 대체적으로 methanol 추출물에 비해 비교적 높은 함량을 나타내었으며, 특히 EtOAc 층과 BuOH 층에서 높은 함량을 보이고 있다. 그 중 H-6의 BuOH 층에서 712 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 가장 높은 함량을

나타내었고, H-7의 EtOAc 층과 H-6의 EtOAc 층, H-3의 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.

Table 2. Contents of total polyphenols in methanol extracts of Jeju plants.

Sample	Total polyphenols($\mu\text{g}/\text{mg}$) ¹⁾	Total phenol content(%)
H-1	278 \pm 5 ²⁾	28
H-2	<5	<0.5
H-3	58 \pm 3	6
H-4	<5	<0.5
H-5	<5	<0.5
H-6	92 \pm 1	9
H-7	<5	<0.5
H-8	19 \pm 1	2
H-9	283 \pm 3	28
H-10	50 \pm 1	5
H-11	89 \pm 5	9

1) Milligrams of total polyphenol content/g of methanol extract of plants based on tannic acid as standard.

2) Each value is mean \pm S.D.(n \geq 3)

Table 3. Contents of total polyphenols in solvent extracts of Jeju plants.

Fractions	Total polyphenols ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ¹⁾	Total phenol content(%)	Fractions	Total polyphenols ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total phenol content(%)
1-Hexane	<5 ²⁾	<0	8-Hexane	3.0±0.2	0.3
1-EtOAc	487±3	49	8-EtOAc	145±4	15
1-BuOH	280±3	28	8-BuOH	55.9±0.6	6
1-H ₂ O	210.0±0.4	21	8-H ₂ O	<5	<0
3-Hex	<5	<0	9-Hexane	<5	<0
3-EtOAc	122±1	12	9-EtOAc	216±1	22
3-BuOH	506±16	51	9-BuOH	234±3	23
3-H ₂ O	239±2	24	9-H ₂ O	253±4	25
6-Hexane	113±5	11	10-Hexane	<5	<0
6-EtOAc	558±29	56	10-EtOAc	203±1	20
6-BuOH	712±20	71	10-BuOH	247±2	25
6-H ₂ O	144±3	14	10-H ₂ O	<5	<0
7-Hexane	<5	<0	11-Hexane	<5	<0
7-EtOAc	573±13	57	11-EtOAc	334±4	33
7-BuOH	308±5	31	11-BuOH	89±1	9
7-H ₂ O	83±2	8	11-H ₂ O	<5	<0

1) Milligrams of total polyphenol content/g of methanol extract of plants based on tannic acid as standard.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

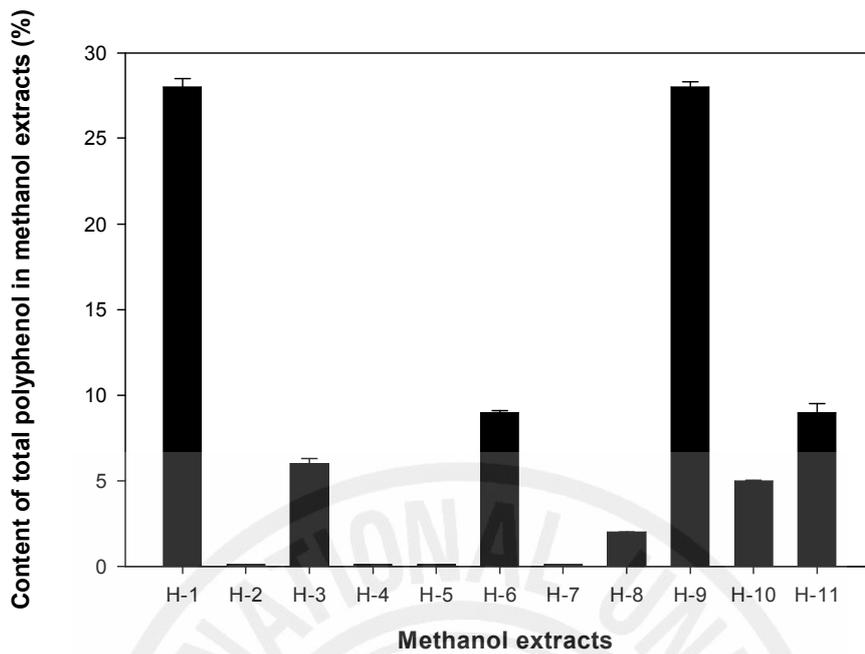


Figure 5. Contents of total polyphenols in methanol extracts of Jeju plants.

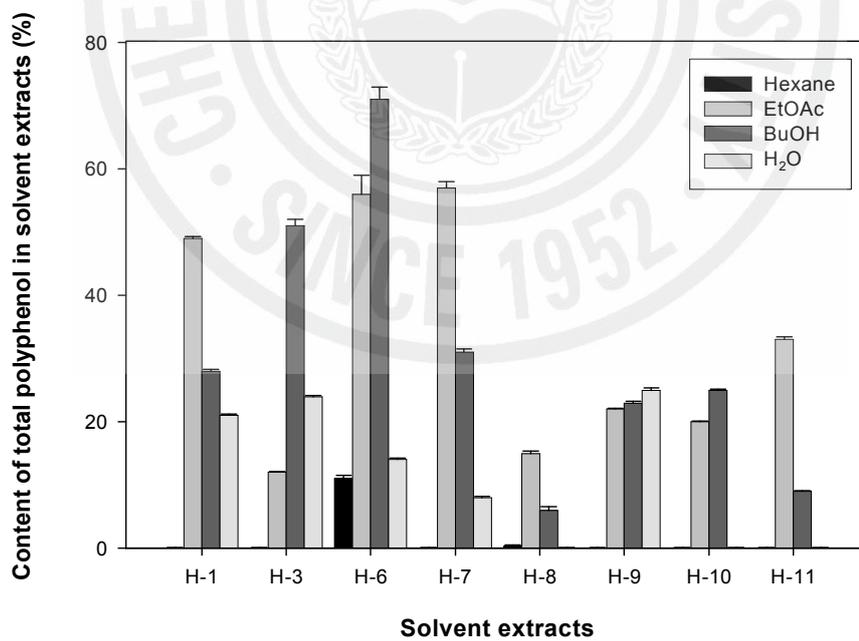


Figure 6. Contents of total polyphenols in solvent extracts of Jeju plants.

2. 항산화 실험

2-1. DPPH free radical 소거 활성 측정

1) 시료 추출물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

항산화 물질의 가장 큰 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식물중의 항산화 효과나 인체에 노화를 억제시키는 척도로 이용된다. DPPH는 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. DPPH alcohol 용액은 517nm에서 강한 UV흡수가 있으며, 실온에서 1시간 정도는 매우 안정한 라디칼이다. 전자공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 됨으로써 517nm에서 나타났던 DPPH의 특이적인 흡수 band가 사라지게 되는데 가시적인 보라색은 안정해진 분자의 몰수에 비례하여 노란색으로 변하게 된다. 이러한 DPPH는 dioxane이나 CCl₄와 같은 비극성 용매 내에서는 2차, 3차 산화 반응이 일어나기도 하나 DPPH의 질소 원자와 alcohol 간에 수소 결합이 형성되기 때문에 alcohol 용액 내에서는 비교적 안정하다.^{50~52)}

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과는 Table 4와 Figure 7과 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 각 추출물의 IC₅₀ 값은 H-10 에서 8.6 $\mu\text{g/mL}$ 으로, 비교적 높은 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, H-1 (19 $\mu\text{g/mL}$) > H-11 (20.8 $\mu\text{g/mL}$) > H-9 (21 $\mu\text{g/mL}$) > H-8 (31 $\mu\text{g/mL}$) > H-7 (53 $\mu\text{g/mL}$) > H-3 (96 $\mu\text{g/mL}$) > H-6 (106 $\mu\text{g/mL}$) > H-5 (113 $\mu\text{g/mL}$) > H-2 (154 $\mu\text{g/mL}$) > H-4 (248 $\mu\text{g/mL}$) 순으로 조사되었다. 이러한 결과는 비교 대조군인 Vitamin C나 BHA와 비교하였을 때 아주 좋은 소거 활성을 나타내지는 않았지만, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 충분히 소

거 활성이 있다고 할 수 있어, 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물에 대해 유기 용매 분획을 실시하였다. 총 폴리페놀의 함량과 free radical 소거활성과의 관계를 살펴보면 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화 활성이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

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

Sample	DPPH free radical scavenging(%)	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)
H-1	90±0.3 ²⁾	19±1 ²⁾
H-2	7±0.2	154±5
H-3	42±0.2	96±1
H-4	3±0.5	248±3
H-5	7±0.8	113±1
H-6	46±2	106±2
H-7	19±1	53±1
H-8	26±3	31±3
H-9	91±0.6	21±0.4
H-10	77±6	8.6±1
H-11	49±0.3	20.8±0.1
Vit.C	93±0.2	2.7±0.1
BHA	92±0.1	3.4±0.1

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

2) 시료 분획물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

제주도 자생식물 11종 MeOH 추출물의 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과를 Table 5와 Figure 8에 나타내었다. H-1의 분획물 중 EtOAc 층의 IC_{50} 이 $1.6 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군 Vitamin C ($2.7 \mu\text{g/mL}$)보다 더 우수한 활성을 나타내었으며, BuOH 층과 H_2O 층의 IC_{50} 값은 각각 $5.8 \mu\text{g/mL}$, $6.2 \mu\text{g/mL}$ 으로 비교적 높은 활성을 가진 것으로 여겨진다. H-3의 분획물은 BuOH 층에서 IC_{50} 이 $2.4 \mu\text{g/mL}$ 으로 높은 소거 활성을 나타내어 대조군 Vitamin C ($2.7 \mu\text{g/mL}$)보다 좋은 활성을 보였으며, 다른 시료들과 달리 EtOAc 층보다 H_2O 층에서 더 좋은 활성을 나타내었는데, IC_{50} 값은 각각 H_2O 층에서 $2.5 \mu\text{g/mL}$, EtOAc 층에서 $3.3 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군인 Vitamin C ($2.7 \mu\text{g/mL}$) 및 BHA ($3.4 \mu\text{g/mL}$)와 유사한 소거 활성을 가짐을 알 수 있었으며, 매우 우수한 free radical 소거 활성을 나타내었다. H-6의 분획물도 BuOH 층에서 IC_{50} 이 $3.1 \mu\text{g/mL}$ 으로 좋은 소거 활성을 보여 BHA ($3.4 \mu\text{g/mL}$)보다 좋은 활성을 나타내었고, EtOAc 층에서 $8.7 \mu\text{g/mL}$, H_2O 층에서 $16 \mu\text{g/mL}$ 순으로 소거 활성이 나타났다. H-7의 분획물은 EtOAc 층에서 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군 Vitamin C ($2.7 \mu\text{g/mL}$)보다 좋은 활성을 나타내었으며, BuOH 층에서 $4.1 \mu\text{g/mL}$, Hexane 층에서 $40 \mu\text{g/mL}$ 의 소거 활성을 보였다. H-8의 분획물의 소거 활성은 EtOAc 층에서 $12.2 \mu\text{g/mL}$, BuOH 층에서 $28 \mu\text{g/mL}$, H_2O 층에서 $50 \mu\text{g/mL}$ 보였으며, H-9 분획물은 특이하게 H_2O 층에서 IC_{50} 이 $4.7 \mu\text{g/mL}$ 으로 높은 활성을 나타내었고, BuOH 층에서 $6.1 \mu\text{g/mL}$, EtOAc 층에서 $6.8 \mu\text{g/mL}$, Hexane 층에서 $54 \mu\text{g/mL}$ 순으로 소거 활성을 보였다. H-10 분획물은 EtOAc 층에서 IC_{50} 이 $3.7 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군 BHA ($3.4 \mu\text{g/mL}$)와 유사한 활성을 확인할 수 있었고, BuOH 층과 H_2O 층의 IC_{50} 값은 각각 $4.5 \mu\text{g/mL}$, $37.2 \mu\text{g/mL}$ 을 보였으며, H-11 분획물은 BuOH 층, EtOAc 층, H_2O 층 순으로 소거 활성을 나타내었고 이때, 분획물의 IC_{50} 값은 각각 $4.5 \mu\text{g/mL}$, $6.8 \mu\text{g/mL}$, $52 \mu\text{g/mL}$ 임을 알 수 있었다.

Table 5. DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.

Fractions	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)	Fractions	IC ₅₀ (μg/mL)
1-Hexane	>100 ²⁾	8-Hexane	>100 ²⁾
1-EtOAc	1.6±0.5	8-EtOAc	12.2±0.5
1-BuOH	5.8±0.3	8-BuOH	28±2
1-H ₂ O	6.2±0.3	8-H ₂ O	50.2±0.1
3-Hexane	>100	9-Hexane	54±2
3-EtOAc	3.3±0.2	9-EtOAc	6.8±0.7
3-BuOH	2.4±0.1	9-BuOH	6.1±0.3
3-H ₂ O	2.5±0.2	9-H ₂ O	4.7±0.1
6-Hexane	>100	10-Hexane	>100
6-EtOAc	8.7±0.2	10-EtOAc	3.7±0.2
6-BuOH	3.1±0.1	10-BuOH	4.5±0.1
6-H ₂ O	16±3	10-H ₂ O	37.2±0.8
7-Hexane	40±4	11-Hexane	>100
7-EtOAc	2.5±0.1	11-EtOAc	6.8±0.3
7-BuOH	4.1±0.3	11-BuOH	4.5±0.2
7-H ₂ O	>100	11-H ₂ O	52±3
Vitamin C	2.7±0.1	BHA	3.4±0.1

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

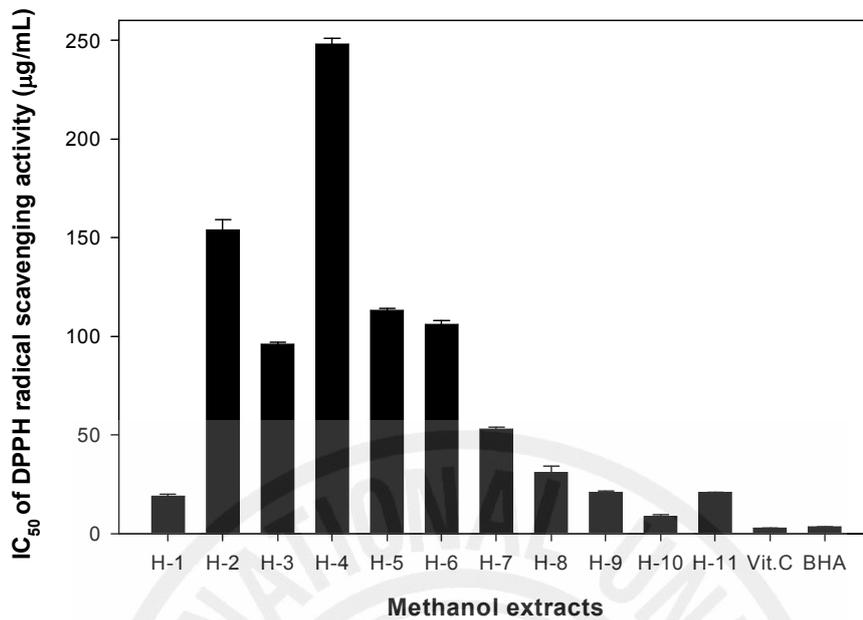


Figure 7. DPPH free radical scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants.

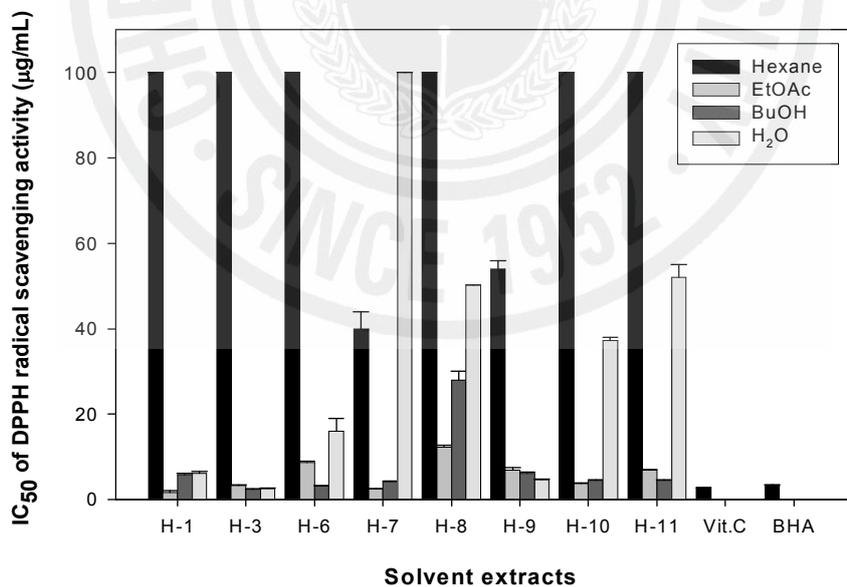


Figure 8. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of Jeju plants.

2-2. Nitric oxide 생성 저해 활성 측정

1) 시료 추출물의 Nitric oxide 생성 저해 활성 측정

활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진⁵³⁾ 질소산화물(NO)은 세포독성이 강하며 다량의 NO가 생성되면 nitroization, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 특히 대식세포가 활성화 되면서 생성되는 NO는 주위조직에 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 NO의 반감기는 6~10초로 대단히 짧기 때문에 실질적 또는 직접적으로 검출하는데 많은 어려움이 따른다. 이 때문에 대부분의 NO 측정을 위한 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 nitrite, nitrate를 측정하는 간접적인 방법으로 이루어지고 있다.⁵⁴⁾

아질산염은 식육 또는 어육제품의 발색제, 풍미안정제 및 clostridium botulinum 등 세균의 생육억제제로서 식품 가공 및 저장에 널리 이용되고 있다.^{55,56)} 또한 이는 식물체내에서나 인체의 소화기관 및 식품의 저장 중에 질산 환원 효소나 환원 세균 등의 작용에 의해 질산성염에서 환원되어 생성되기도 한다.^{57,58)}

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_2^- , 아질산염의 양을 측정하는 방법으로 산출하였다.⁵⁹⁾ Quercetin을 대조군로 하여 각 시료에 대한 저해 활성 측정 결과는 Table 6 및 Figure 9와 같다.

측정 결과 quercetin은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 77%의 nitric oxide 생성 저해 활성을 보인데 반해, 제주도에서 자생하고 있는 식물 11종의 경우 같은 농도에서 nitric oxide 생성 저해 활성이 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 이용된 methanol 추출물 중에서 H-6 methanol 추출물의 nitric oxide 생성 저해율이 55%로 가장 높은 저해율을 보였으며, H-3 methanol 추출물이 47%, H-5 methanol 추출물이 41%, H-9 methanol 추출물이 39%, H-1

methanol 추출물이 38%, H-7 methanol 추출물이 34%, H-10 methanol 추출물이 32%, H-2 methanol 추출물과 H-11 methanol 추출물이 27%, H-4 methanol 추출물이 23%, H-8 methanol 추출물이 22% 순으로 조사되었다.

Table 6. Nitric oxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants.

Sample ¹⁾	Nitric oxide scavenging activity(%)
H-1	38±2 ²⁾
H-2	27±6
H-3	47±2
H-4	23±1
H-5	41±0.4
H-6	55±0.3
H-7	34±1
H-8	22±6
H-9	39±0.2
H-10	32±0.3
H-11	27±0.1
Quercetin	77±1

1) The final concentration of methanol extracts for reaction was 500 µg/mL.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

2) 시료 분획물의 Nitric oxide 생성 저해 활성 측정

제주도 자생식물 11종 methanol 추출물의 nitric oxide 생성 저해 활성 측정하여 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 nitric oxide 생성 저해 활성을 측정한 결과를 Table 7과 Figure 10에 나타내었다.

결과에서 알 수 있듯이 H-6의 분획물들이 매우 우수한 nitric oxide 생성 저해 활성을 나타내는 것으로 조사되었는데, 분획물 중에서 EtOAc 층이 85%의 저해율을 보여 대조군인 quercetin(77%)보다 높은 저해 효과를 보였고, BuOH 층에서 71%, Hexane 층에서 56%, H₂O 55%로 우수한 저해 활성을 나타내었다. H-1 분획물은 BuOH 44% EtOAc 층에서 41%, H₂O 층에서 39%, Hexane 층에서 20%순으로 조사되었으며, H-3 분획물은 EtOAc 층에서 56%, BuOH 층에서 54%, H₂O 층에서 49%, Hexane 층에서 43%로 4개의 분획물에서 비교적 좋은 저해 활성을 나타내었다. H-7 분획물은 EtOAc 층에서 62%의 nitric oxide 생성 저해율을 나타내어 quercetin(77%)보다 저해 활성은 낮았으나, 다른 분획물들에 비해 우수한 저해활성을 확인할 수 있었고, BuOH 층에서 42%의 활성을 보였으나, Hexane 층과 H₂O층에서는 20% 미만의 낮은 저해 활성을 측정 할 수 있었다. H-8 분획물은 EtOAc 층에서 51%의 저해 활성을 보였으며, BuOH 층에서 31%, Hexane 층에서 21%의 활성을 보였으나, H₂O 층에서 20% 미만으로 낮은 저해 활성을 확인 할 수 있었다. H-9 분획물의 nitric oxide 생성 저해 활성은 EtOAc 층에서 54%, BuOH 층에서 44%, H₂O 층에서 40%, Hexane 층에서 36%순으로 조사되었고, H-10 분획물은 BuOH 층에서 41%, EtOAc 층에서 39%로 나타났으나, H₂O층과 Hexane층에서는 20% 미만의 낮은 저해 활성을 보였다. H-11 분획물은 EtOAc 층에서 54% 로 비교적 좋은 nitric oxide 생성 저해 활성을 보였고 Hexane 층에서 32%의 저해 활성을 나타내었으나, BuOH 층과 H₂O 층에서 20% 미만 낮은 저해 활성을 보였다.

Table 7. Nitric oxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.

Fractions ¹⁾	Nitric oxide scavenging activity(%)	Fractions	Nitric oxide scavenging activity(%)
1-Hexane	20±2 ²⁾	8-Hexane	21±3
1-EtOAc	41±1	8-EtOAc	51±2
1-BuOH	44±1	8-BuOH	31±1
1-H ₂ O	39±1	8-H ₂ O	16±0.7
3-Hexane	43±1	9-Hexane	36±0.6
3-EtOAc	56±0.3	9-EtOAc	54±0.4
3-BuOH	54±2	9-BuOH	44±0.6
3-H ₂ O	49±0.6	9-H ₂ O	40±2
6-Hexane	56±2	10-Hexane	5±0.1
6-EtOAc	85±6	10-EtOAc	39±0.7
6-BuOH	71±0.2	10-BuOH	41±0.2
6-H ₂ O	55±1	10-H ₂ O	15±1
7-Hexane	10±5	11-Hexane	32±2
7-EtOAc	62±0.5	11-EtOAc	54±2
7-BuOH	42±0.2	11-BuOH	19±1
7-H ₂ O	9±0.9	11-H ₂ O	5±1
Quercetin	77±1		

1) The final concentration of methanol extracts for reaction was 500 µg/mL.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

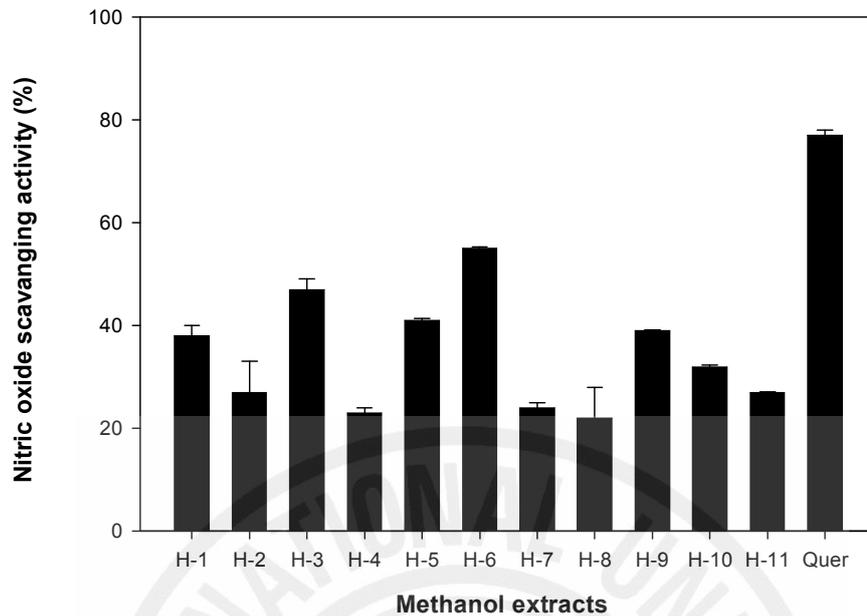


Figure 9. Nitric oxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants. (Quer : Quercetin)

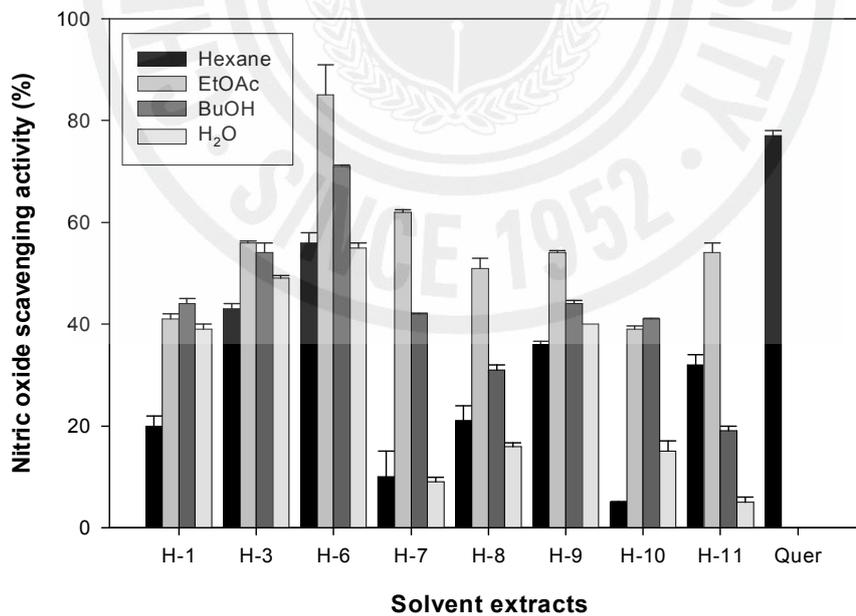


Figure 10. Nitric oxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.

2-3. Xanthine oxidase 억제 효과 측정

1) 시료 추출물의 Xanthine oxidase 억제 효과 측정

Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Uric acid의 축적은 고요산혈증과 통풍을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 uric acid 형성의 억제제가 이들 질환을 위한 치료 물질로서 유용할 것이다. 더욱이 xanthine oxidase에 의해 생성된 산소 유리기는 세포의 손상을 초래한다.⁶⁰⁾ 따라서 활성 산소 라디칼을 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것이다. 통풍은 이러한 uric acid의 수치가 높아지면서 일어나며, 이들이 결정체를 이루어 관절에 흡착하면 염증을 유발하고, 심한 경우 신장이나 심장 등에 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다.⁵⁹⁾

Xanthine oxidase 저해제는 통풍, 신장결석, 허혈, 심근증을 일으키는 요산혈증에 대한 치료제로 사용되어 왔으며 통풍치료에 사용되는 물질로는 allopurinol, alloxanthine 등이 알려져 있다.⁵⁹⁾

제주도에서 자생하는 식물 11종에 대한 Xanthine oxidase의 억제 효과는 allopurinol을 대조군로 이용하여 측정하였으며 결과는 Table 8과 Figure 11에 나타내었다. 각 시료 methanol 추출물에서 IC₅₀ 값은 H-9의 methanol 추출물에서 59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높은 xanthine oxidase의 억제 효과를 나타내었고, H-11의 methanol 추출물에서 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-1의 methanol 추출물이 219 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-6의 methanol 추출물에서 242 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-7의 methanol 추출물이 282 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-3의 methanol 추출물에서 303 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 순으로 조사되었다. 그러나 H-2, H-4, H-5, H-8, H-10의 methanol 추출물에서 IC₅₀ 값은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 측정되어 xanthine oxidase의 억제 효과가 그다지 크지 않은 것으로 조사되었다.

Table 8. Xanthine oxidase inhibition activities of methanol extract of Jeju plants.

Sample	IC ₅₀ ¹⁾ (μ g/mL)
H-1	219 \pm 1 ²⁾
H-2	>500
H-3	303 \pm 12
H-4	>500
H-5	>500
H-6	242 \pm 11
H-7	282 \pm 5
H-8	>500
H-9	59 \pm 3
H-10	>500
H-11	140 \pm 4
Allopurinol	7 \pm 0.8

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean \pm S.D.(n \geq 3)

2) 시료 분획물의 Xanthine oxidase 억제 효과 측정

제주도 자생식물 11종 methanol 추출물의 항산화 활성을 측정하여 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 xanthine oxidase 억제 효과를 측정한 결과를 Table 9과 Figure 12에 나타내었다.

각각의 시료 분획물의 xanthine oxidase 억제 효과에 대한 IC₅₀ 값을 살펴보면 H-1의 분획물은 EtOAc 층에서 87 µg/mL으로 좋은 활성을 나타내었으며 H₂O 층에서 287 µg/mL, BuOH 층에서 304 µg/mL이었으나, Hexane 층에서는 500 µg/mL이상으로 조사되었고, H-3의 분획물은 EtOAc 층에서 74 µg/mL, BuOH 층에서 163 µg/mL, H₂O 층에서 234 µg/mL, Hexane 층에서 356 µg/mL으로 측정되었다. H-6의 분획물은 EtOAc 층에서 16 µg/mL으로, 대조군 allopurinol의 IC₅₀ 값인 7 µg/mL과 비교하였을 때 비교적 우수한 xanthine oxidase 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다. BuOH 층에서도 43 µg/mL으로 좋은 억제 효과를 보였으나, Hexane 층과 H₂O 층의 IC₅₀ 값은 500 µg/mL이상으로 활성 효과가 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. H-7의 분획물 역시 EtOAc 층에서 IC₅₀ 값이 17 µg/mL으로 대조군 allopurinol의 IC₅₀ 값인 7 µg/mL과 비교하였을 때 비교적 우수한 xanthine oxidase 억제 효과를 나타내었고, Hexane 층에서 106 µg/mL, BuOH 층에서 352 µg/mL로 측정되었으나, H₂O 층에서 500 µg/mL이상으로 조사되었다. H-8의 분획물은 Hexane 층, EtOAc 층, BuOH 층, H₂O 층에서 모두 IC₅₀ 값이 500 µg/mL이상으로 조사되어 활성 억제 효과가 크지 않은 것으로 나타났고, H-9의 분획물은 EtOAc 층에서 57 µg/mL, BuOH 층에서 243 µg/mL, H₂O 층에서 340 µg/mL 순으로 나타났다. H-10의 분획물도 Hexane 층, EtOAc 층, BuOH 층, H₂O 층에서 모두 IC₅₀ 값이 500 µg/mL이상으로 조사되어 활성 억제 효과가 크지 않은 것으로 나타났고, H-11의 분획물은 EtOAc 층에서 IC₅₀ 값이 74 µg/mL으로 조사되었고, Hexane 층에서 377 µg/mL으로 나타났으나, BuOH 층과 H₂O 층에서 IC₅₀ 값은 500 µg/mL 이상으로 측정되었다.

Table 9. Xanthine oxidase inhibition activities of solvent extracts of Jeju plants.

Fractions	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)	Fractions	IC ₅₀ (μg/mL)
1-Hexane	>500 ²⁾	8-Hexane	>500
1-EtOAc	87±5	8-EtOAc	>500
1-BuOH	304±14	8-BuOH	>500
1-H ₂ O	287±16	8-H ₂ O	>500
3-Hexane	356±31	9-Hexane	>500
3-EtOAc	74±9	9-EtOAc	57±2
3-BuOH	163±5	9-BuOH	243±22
3-H ₂ O	234±21	9-H ₂ O	340±14
6-Hexane	>500	10-Hexane	>500
6-EtOAc	16±0.1	10-EtOAc	>500
6-BuOH	43±26	10-BuOH	>500
6-H ₂ O	>500	10-H ₂ O	>500
7-Hexane	106±3	11-Hexane	377±5
7-EtOAc	17±0.4	11-EtOAc	74±1
7-BuOH	352±9	11-BuOH	>500
7-H ₂ O	>500	11-H ₂ O	>500
Allopurinol	7±0.8		

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

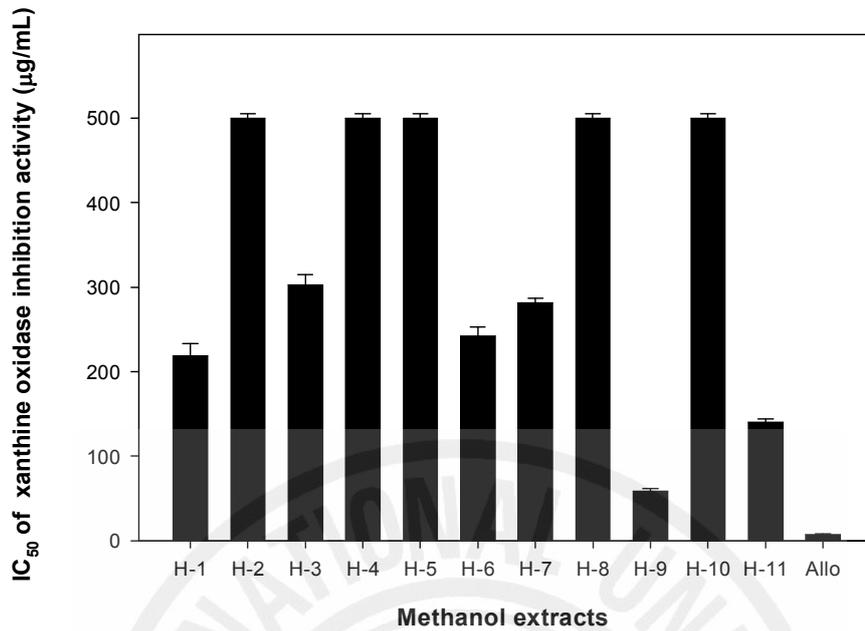


Figure 11. Xanthine oxidase inhibition activities of methanol extract of Jeju plants.

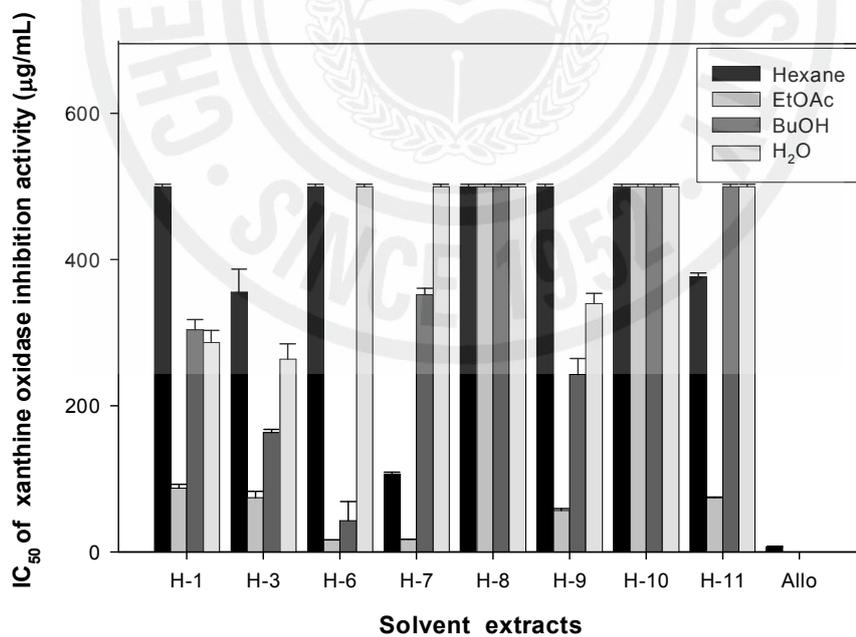


Figure 12. Xanthine oxidase inhibition activities of solvent extracts of Jeju plants.

2-4. Superoxide 소거 활성 측정

1) 시료 추출물의 Superoxide 소거 활성 측정

생체 내에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성 산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 superoxide dismutase(SOD)이다.⁶¹⁾

생명체에 존재하는 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 superoxide를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H₂O₂는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 자신은 분해하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다.⁶²⁾

xanthine/xanthine oxidase 반응계에서 형성되는 superoxide radical에 대한 저해작용을 측정함으로써⁶³⁾ 제주도 자생식물 11종의 superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정결과를 Table 10과 Figure 13에 나타내었다.

결과에서 보는 바와 같이 각 시료 methanol 추출물의 IC₅₀ 값을 살펴보면 H-1의 추출물에서 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가장 우수한 superoxide radical 소거 효과를 보였으며, 대조군인 allopurinol의 IC₅₀ 값 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 소거 활성을 보였다. H-9의 methanol 추출물과 H-11의 methanol 추출물의 IC₅₀ 각각 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 비교적 양호한 소거 효과를 나타내었고, H-6의 methanol 추출물은 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, H-10의 methanol 추출물은 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 좋은 소거 활성을 확인할 수 있었다. H-7의 methanol 추출물의 IC₅₀ 값은 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고, H-3의 methanol 추출물은 127 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-5의 methanol 추출물은 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, H-4의 methanol 추출물은 292 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H-8의 methanol 추출물은 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 순으로 조사되어 대체적으로 이들 성분들은 활성이 존재하는 것으로 나타났다.

Table 10. Superoxide scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants.

Sample	IC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)
H-1	13±1 ²⁾
H-2	>500
H-3	127±19
H-4	292±24
H-5	247±12
H-6	47±11
H-7	105±1
H-8	340±9
H-9	34±4
H-10	56±3
H-11	37±8
SOD ³⁾	2±0.3
Allopurinol	16±0.8

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

3) SOD (superoxide dismutase)

2) 시료 분획물의 Superoxide 소거 활성 측정

제주도 자생식물 11종 methanol 추출물의 항산화 활성을 측정하여 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 superoxide 소거 활성을 측정한 결과를 Table 11 및 Figure 14에 나타내었다. 각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC₅₀ 값을 살펴보면 H-1의 분획물의 EtOAc 층에서 7 µg/mL, H₂O 층에서 15 µg/mL, BuOH 층에서 17 µg/mL으로 대조군인 allopurinol의 IC₅₀ 값 16 µg/mL과 비교했을 때, 가장 우수한 superoxide 소거 활성 효과를 나타내었으나, Hexane 층에서는 500 µg/mL 이상으로 측정되었다. H-3의 분획물은 BuOH 층에서 13 µg/mL으로 allopurinol(16 µg/mL)보다 우수한 활성을 나타내었고, H₂O 층에서 25 µg/mL, EtOAc 층에서 38 µg/mL, Hexane 층에서 190 µg/mL 순으로 조사되었고, H-6의 분획물은 EtOAc 층에서 9 µg/mL과 BuOH 층에서 14 µg/mL으로 대조군로 사용한 allopurinol(16 µg/mL)보다 좋은 superoxide 소거 활성 효과를 나타내었으며, H₂O 층에서 48 µg/mL Hexane 층에서 472 µg/mL의 소거 활성을 보였다. H-7의 분획물은 EtOAc 층에서 9 µg/mL, BuOH 층에서 65 µg/mL, Hexane 층에서 168 µg/mL의 소거 활성을 보였으나, H₂O 층에서 500 µg/mL 이상으로 조사되어 활성 억제 효과가 크지 않은 것으로 나타났고, H-8의 분획물은 EtOAc 층에서 79 µg/mL, Hexane 층에서 107 µg/mL, BuOH 층에서 448 µg/mL, H₂O 층에서 500 µg/mL 이상으로 조사되었다. H-9의 분획물은 EtOAc 층에서 21 µg/mL, BuOH 층에서 23 µg/mL, H₂O 층에서 24 µg/mL으로 비교적 우수한 superoxide 소거 활성 효과를 나타내었으며, Hexane 층에서도 86 µg/mL으로 다소 높은 소거 활성을 보였다. H-10의 분획물은 EtOAc 층에서 16 µg/mL, BuOH 층에서 30 µg/mL, H₂O 층에서 170 µg/mL, Hexane 층에서 264 µg/mL 순으로 소거 활성이 측정되었고, H-11의 분획물은 EtOAc 층에서 19 µg/mL, BuOH 층에서 87 µg/mL, Hexane 층에서 153 µg/mL으로 나타났으나, H₂O 층에서 500 µg/mL 이상으로 조사되었으며, xanthine oxidase 활성 억제 실험에서와 마찬가지로 이들 성분들은 대체적으로 양호한 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Table 11. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju Plants.

Fractions	IC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fractions	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1-Hexane	>500 ²⁾	8-Hexane	107 \pm 0.2
1-EtOAc	7 \pm 0.7	8-EtOAc	79 \pm 2
1-BuOH	17 \pm 0.6	8-BuOH	448 \pm 21
1-H ₂ O	15 \pm 2	8-H ₂ O	>500
3-Hexane	190 \pm 15	9-Hexane	86 \pm 4
3-EtOAc	38 \pm 2	9-EtOAc	21 \pm 1
3-BuOH	13 \pm 0.1	9-BuOH	23 \pm 1
3-H ₂ O	25 \pm 1	9-H ₂ O	24 \pm 2
6-Hexane	472 \pm 22	10-Hexane	264 \pm 3
6-EtOAc	9 \pm 1	10-EtOAc	16 \pm 0.4
6-BuOH	14 \pm 1	10-BuOH	30 \pm 5
6-H ₂ O	48 \pm 10	10-H ₂ O	170 \pm 13
7-Hexane	168 \pm 5	11-Hexane	153 \pm 3
7-EtOAc	9 \pm 0.8	11-EtOAc	19 \pm 1
7-BuOH	65 \pm 0.7	11-BuOH	87 \pm 5
7-H ₂ O	>500	11-H ₂ O	>500
SOD ³⁾	2 \pm 0.3	Allopurinol	16 \pm 0.8

1) IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) Each value is mean \pm S.D.(n \geq 3)

3) SOD (superoxide dismutase)

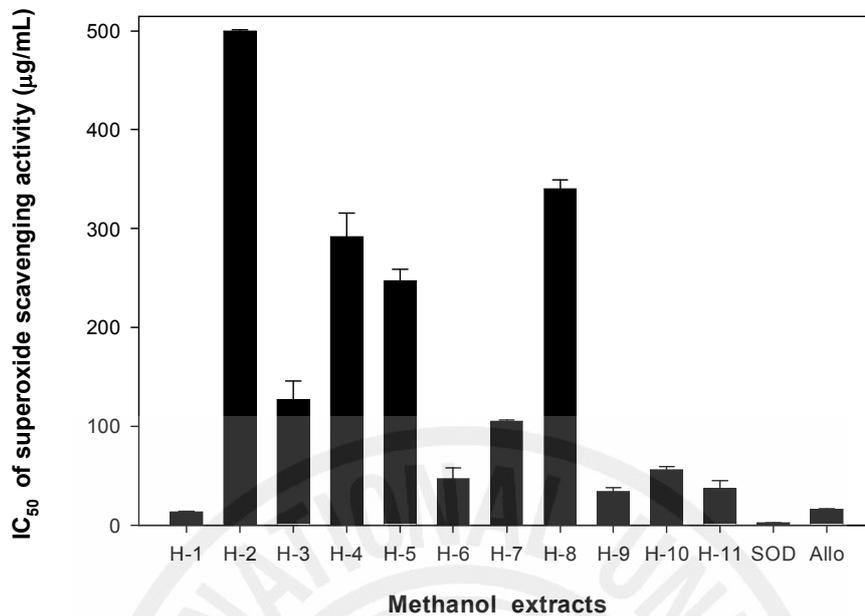


Figure 13. Superoxide scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants.

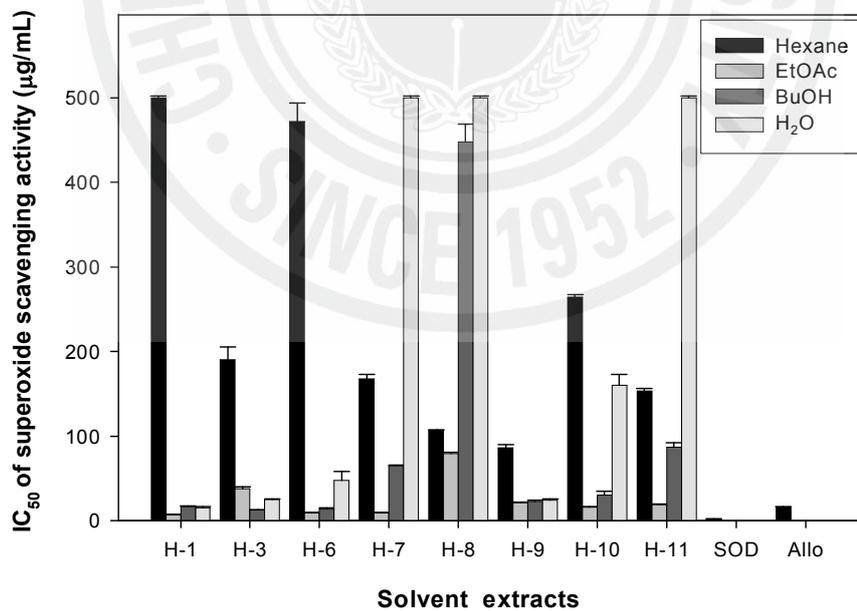


Figure 14. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju Plants.

2-5. Hydroxyl radical 소거 활성 측정

1) 시료 추출물의 Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Fe^{2+} 와 H_2O_2 가 반응하는 Fenton's reaction에 의해 생성되어진 Hydroxyl radical이 2-deoxyribose를 산화시켜 malondialdehyde(MDA)로 분해시킨다. 이때 MDA를 532nm에서 측정하여 hydroxyl radical을 확인하여 반응정도를 확인하고자 하였다.⁶⁴⁾ Hydroxyl radical은 활성산소 중에서도 강력한 것으로서, hydroxyl radical을 소거하는 효과는 항산화제로서 그 의의가 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 분해되는 정도를 TBA 발색법을 이용해 측정하였다.⁵³⁾

제주도 자생식물 11종의 methanol 추출물의 소거능을 조사한 결과는 Table 12과 Figure 15에 나타내었으며, 시료농도 100 $\mu g/mL$ 에서 비교한 결과 H-6 methanol 추출물에서 74%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 측정할 수 있었는데, 이는 대조군로 이용한 Vitamin C의 77%보다는 낮았으나, BHA에 의한 73%의 소거 활성보다 좋은 효과를 확인할 수 있었다. 다음으로 H-4의 methanol 추출물과 H-2의 methanol 추출물이 72%로 비교적 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 보였으며, H-1의 methanol 추출물과 H-9의 methanol 추출물이 70%로 좋은 소거 활성을 나타내었다. H-8의 methanol 추출물과 H-11의 methanol 추출물은 69%, H-3의 methanol 추출물이 68%, H-10의 methanol 추출물이 67%, H-7의 methanol 추출물이 66% 순으로 hydroxyl radical 소거 활성이 조사되었다.

Table 12. Hydroxyl radical scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants.

Sample ¹⁾	Hydroxyl radical scavenging activity (%) ²⁾
H-1	70±2
H-2	72±4
H-3	68±5
H-4	72±1
H-5	67±3
H-6	74±1
H-7	66±3
H-8	69±6
H-9	70±4
H-10	67±1
H-11	69±3
BHA	73±2
Vi. C	77±1

1) The final concentration of methanol extracts was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2) Each value is mean \pm S.D.(n \geq 3)

2) 시료 분획물의 Hydroxyl radical 소거 활성 측정

제주도 자생식물 11종 methanol 추출물의 항산화 활성을 측정하여 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 시료 추출물 8종에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 Hydroxyl radical 소거 활성을 측정한 결과를 Table 13와 Figure 16에 나타내었다.

유기 용매로 추출 분리한 분획물에 대해서도 시료농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 비교분석 하였는데, H-1 분획물은 BuOH 층에서 76%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거 활성을 보였으며, EtOAc 층과 H₂O 층에서도 75%의 매우 좋은 활성을 나타내었다. 이는 대조군로 이용한 Vitamin C의 77% 소거 활성보다 낮았으나, BHA의 73% 보다 좋은 소거 활성을 확인할 수 있었고, Hexane 층에서 70%의 활성을 보여 4개의 분획물 모두 비교적 우수한 소거 활성을 나타내었다. H-3 분획물은 H₂O 층에서 71% 로 가장 우수한 활성을 보였으며, EtOAc 층에서 66%, Hexane 층에서 61%, BuOH 층에서 54% 순으로 hydroxyl radical 소거 활성이 측정되었고, H-6 분획물은 H₂O 층에서 71%, BuOH 층에서 61%, EtOAc 층에서 60%의 활성을 보였으나, Hexane 층에서는 53%의 낮은 소거 활성을 나타내었다. H-7 분획물도 H₂O 층에서 68%의 활성을 보였고, EtOAc 층에서 65%, BuOH 층에서 63%, Hexane 층에서 26%의 활성을 나타내었고, H-8 분획물은 BuOH 층에서 68%, H₂O 층에서 67%, EtOAc 층에서 63%, Hexane 층에서 58%의 소거 활성을 조사할 수 있었으며, H-9의 분획물은 H₂O 층에서 71%, BuOH 층에서 69%, EtOAc 층과 Hexane 층에서 66%순으로 소거 활성이 측정되었다. H-10 분획물은 H₂O 층에서 71%, BuOH 층에서 69%, EtOAc 층에서 66%, Hexane 층에서 64%의 소거활성을 나타냈으며, H-11 분획물에서는 EtOAc 층에서 70%, H₂O 층에서 68%, BuOH 층에서 67%, Hexane 층에서 53%의 소거 활성을 보였다.

Table 13. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju Plants.

Fractions ¹⁾	Hydroxyl radical scavenging activity(%) ²⁾	Fractions	Hydroxyl radical scavenging activity(%)
1-Hexane	70±1	8-Hexane	58±1
1-EtOAc	75±3	8-EtOAc	63±5
1-BuOH	76±1	8-BuOH	68±3
1-H ₂ O	75±2	8-H ₂ O	67±4
3-Hexane	61±5	9-Hexane	66±5
3-EtOAc	66±3	9-EtOAc	66±4
3-BuOH	54±2	9-BuOH	69±5
3-H ₂ O	71±4	9-H ₂ O	71±3
6-Hexane	53±7	10-Hexane	64±3
6-EtOAc	60±2	10-EtOAc	66±3
6-BuOH	61±3	10-BuOH	69±2
6-H ₂ O	71±3	10-H ₂ O	71±4
7-Hexane	26±4	11-Hexane	53±5
7-EtOAc	65±5	11-EtOAc	70±3
7-BuOH	63±1	11-BuOH	67±3
7-H ₂ O	68±2	11-H ₂ O	68±4
BHA	71±2	Vi. C	77±1

1) The final concentration of stock solution of each sample was 100 µg/mL.

2) Each value is mean ± S.D.(n≥3)

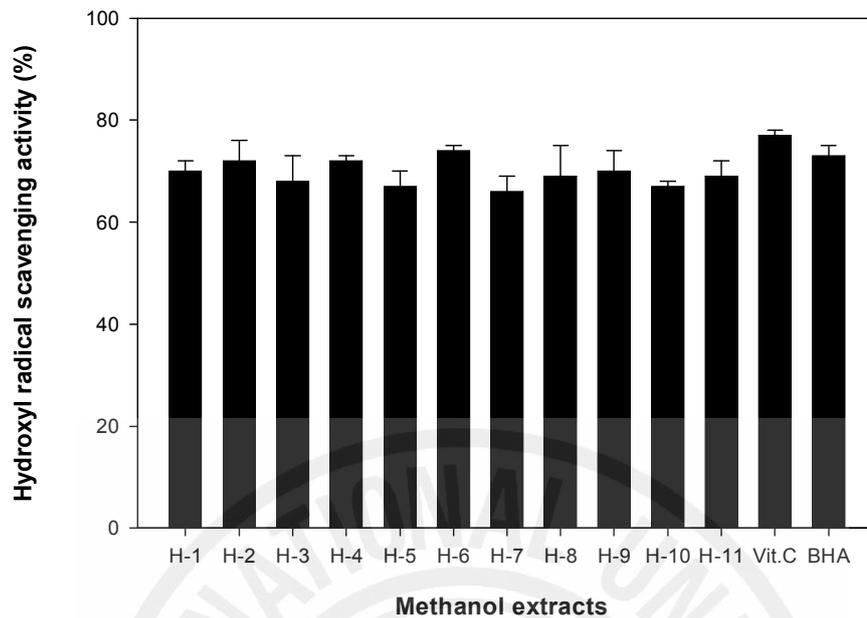


Figure 15. Hydroxyl radical scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants.

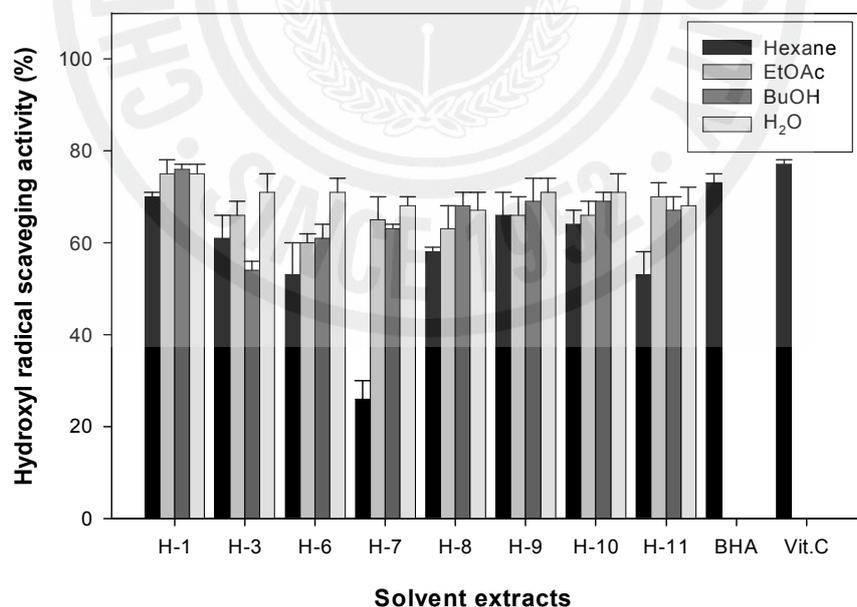


Figure 16. Hydroxyl radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju Plants.

IV. 결 론

본 연구는 제주도에서 자생하는 식물 11종 (구실갯밤나무(수피), 자주괴불주머니(전초), 애기달맞이(지상부), 큰천남성(지상부), 광대나물(전초), 밤나무(잎), 산국(꽃), 약모밀(전초), 산딸나무(잎), 곰취(전초), 떡쭉(전초))을 대상으로 총 폴리페놀 화합물 함량 측정 및 DPPH free radical 소거 활성 측정, nitric oxide 소거 활성 측정, xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정과 hydroxy radical 소거 활성을 측정하여 항산화 기능이 좋은 식물 8종(구실갯밤나무(수피), 애기달맞이(지상부), 밤나무, 산국, 약모밀, 산딸나무, 곰취, 떡쭉)을 선별하였다. 이 식물 8종에 대하여 유기용매 분획을 실시하여 추출 분리한 뒤 각각의 분획물을 얻었으며, 각 분획별도 위와 동일한 항산화 활성을 조사하여 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질의 개발 가능성을 검토하고자 실험을 진행하였다. 다양한 방법으로 이들 식물들의 항산화 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

총 폴리페놀 화합물 함량은 산딸나무 추출물에서 1 mg 추출 당 283 μg 으로 가장 높게 나타났으며, 구실갯밤나무에서 278 μg , 밤나무가 92 μg , 떡쭉이 89 μg , 애기달맞이가 58 μg , 곰취에서 50 μg , 약모밀이 19 μg 으로 측정되었다. 이들 분획물의 총 폴리페놀 함량 분석 결과 대체적으로 methanol 추출물에 비해 비교적 높은 함량을 나타내었으며, 특히 EtOAc 층과 BuOH 층에서 높은 함량을 보였다. 그 중 용매 추출물 1 mg 당 밤나무의 BuOH 층에서 712 μg 으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었고, 산국의 EtOAc 층과 밤나무의 EtOAc 층, 애기달맞이의 BuOH 층이 각각 573 μg , 558 μg , 506 μg 순으로 비교적 높은 폴리페놀 함량을 가지고 있는 것으로 측정되었다. 항산화 활성 결과와 총 폴리페놀 화합물의 함량을 비교한 결과, 총 폴리페놀 화합물의 함량이 높은 분획물이 비교적 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 각 추출물의 IC₅₀ 값은 곰취가 8.6 $\mu\text{g/mL}$ 으로 비교적 높은 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났

으며, 구실잣밤나무는 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 떡쭉이 20.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산딸나무가 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 약모밀이 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산국은 53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이가 96 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 밤나무에서 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 순으로 조사되었으며, 비교 대조군인 Vitamin C나 BHA와 비교하였을 때 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 시료 분획물에서 위와 동일한 방법으로 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 IC_{50} 은 구실잣밤나무의 분획물 중 EtOAc 층의 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이의 분획물은 BuOH 층에서 IC_{50} 이 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높은 소거 활성을 나타내어 대조군 Vitamin C (2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 더 좋은 활성을 나타내었으며, 다른 시료들과 달리 EtOAc 층보다 H_2O 층에서 좋은 활성을 나타내었는데, IC_{50} 값은 각각 H_2O 층에서 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EtOAc 층에서 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군인 Vitamin C (2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 BHA (3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 유사한 소거 활성을 나타내어 매우 우수한 free radical 소거 활성을 가짐을 알 수 있었다. 밤나무의 분획물도 BuOH 층에서 IC_{50} 이 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 좋은 소거 활성을 보여 BHA (3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 좋은 활성을 나타내었고, 약모밀의 분획물의 소거 활성은 EtOAc 층에서 12.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산딸나무 분획물은 특이하게 H_2O 층에서 4.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높은 활성이 측정되었고, 곰취 분획물은 EtOAc 층에서 3.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군 BHA (3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 유사한 활성을 확인할 수 있었으며, 떡쭉 분획물은 BuOH 층에서 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 소거 활성을 나타내었다.

Quercetin은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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. 본 연구에서 이용된 methanol 추출물 중에서 밤나무 추출물의 nitric oxide 생성 저해율이 55%로 가장 높은 저해율을 보였으며, 애기달맞이가 47%, 광대나물이 41%, 산딸나무에서 39%, 구실잣밤나무가 38%, 산국은 34%, 곰취에서 32%, 자주괴불주머니와 떡쭉에서 27%, 큰참남성이 23%, 약모밀이 22% 순으로 조사되었다. 분획물의 nitric oxide 생성 저해 활성 측정결과 분획물의 대부분 EtOAc 층에서 우수한 저해 활성을 나타내었는데, 특히 밤나무의 EtOAc 층이 85%의 저해율을 보여 대조군인 quercetin (77%)보다 높은 저해 효과를 보였고, 산국의 EtOAc 층에서 62%, 애기달맞이의 EtOAc 층에서 56%, 떡쭉의 EtOAc 층에서 54%, 산딸나무의 EtOAc 층에서

54%, 약모밀의 EtOAc 층에서 51%의 Nitric oxide 생성 저해율을 확인 할 수 있었다.

Xanthine oxidase의 억제 효과를 측정한 결과 IC₅₀ 값은 산딸나무의 추출물에서 59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높은 억제 효과를 보였으며, 떡쑥에서 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 구실잣밤나무가 219 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 밤나무는 242 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산국이 282 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이가 303 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 순으로 조사되었으나 자주괴불주머니, 큰천남성, 광대나물, 약모밀, 곰취의 추출물에서 IC₅₀ 값은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 측정되어 xanthine oxidase의 억제 효과가 그다지 크지 않은 것으로 조사되었다. 동일한 방법으로 시료 분획물의 억제 효과 측정 결과 IC₅₀ 값은 밤나무의 분획물중 EtOAc 층에서 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산국의 EtOAc 층에서 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군 allopurinol의 IC₅₀ 값인 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 비교하였을 때 비교적 우수한 xanthine oxidase 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 산딸나무의 분획물은 EtOAc 층에서 57 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이의 EtOAc 층에서 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 떡쑥의 EtOAc 층에서 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 구실잣밤나무의 EtOAc 층에서 87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 분획물의 EtOAc 층에서 활성을 확인할 수 있었다. 그러나 약모밀과 곰취의 분획물은 Hexane 층, EtOAc 층, BuOH 층, H₂O 층에서 모두 IC₅₀ 값이 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 조사되어 활성 억제 효과가 크지 않은 것으로 나타났다.

Superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정결과 각 시료 methanol 추출물의 IC₅₀ 값은 구실잣밤나무의 추출물에서도 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 우수한 소거 효과를 보였으며, 우수한 소거 효과를 나타내어 대조군인 allopurinol의 IC₅₀ 값 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 소거 활성을 보였다. 다음으로 산딸나무의 추출물에서 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 떡쑥이 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 밤나무가 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 곰취에서 56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 좋은 활성을 보였으며, 산국이 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이가 127 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 광대나물은 181 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 큰천남성이 292 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 약모밀이 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 순으로 조사되어 대체적으로 이들 성분들은 활성이 존재하는 것으로 나타났다. 각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC₅₀ 값을 살펴보면 구실잣밤나무의 EtOAc 층에서 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 우수한 superoxide 소거 활성 효과를 나타내었고, 밤나무의 EtOAc 층에서 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산국의 EtOAc층에서 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 애기달맞이의 BuOH 층에서 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 곰취의 EtOAc 층에서 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 나타나 allopurinol의 IC₅₀ 값 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과

비교했을 때, 매우 우수한 활성을 확인할 수 있었으며, 떡쑥의 EtOAc 층에서 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 산딸나무의 EtOAc 층에서 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 약모밀의 EtOAc 층에서 79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 조사되어 비교적 좋은 소거 활성을 보였다.

제주도 자생식물 11종의 methanol 추출물의 Hydroxyl radical 소거 활성을 조사하여 비교한 결과 밤나무 추출물에서 74%로 가장 우수한 소거 활성을 측정할 수 있었는데, 이는 대조군로 이용한 Vitamin C 77%와 BHA 73%의 소거 활성과 비교하였을 때 비슷한 활성 효과를 확인할 수 있었고, 큰천남성과 자주괴불주머니가 72%로 비교적 우수한 소거 활성을 구실잣밤나무와 산딸나무는 70%, 약모밀과 떡쑥에서 69%, 애기달맞이가 68%, 광대나물과 곰취가 67%, 산국이 66% 순으로 좋은 소거 활성을 나타내었다. 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 활성을 확인할 수 있었고, 애기달맞이의 H₂O 층에서 71%, 떡쑥은 EtOAc 층에서 70%, 산딸나무의 H₂O 층에서 71%, 약모밀은 BuOH 층에서 68%, 곰취는 H₂O 층에서 71%, 밤나무는 H₂O 층에서 71%, 산국의 H₂O 층에서 68%의 소거 활성을 보였다.

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 항염증이나 항염, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

V. 참고 문헌

1. 정선우 : Antioxidative Components and Nitrite Scavenging Ability of root and leaves a *Angelica gigas nakai*. 충북대학교 대학원 석사학위논문 (2006)
2. Ham, S.S., Lee, S.Y., Oh, D.H., Jung, S.W., Kim, S.H., Chung, C.K. and Kang, I.J. : Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.*, 27, 745-750 (1998)
3. Al-saikhan, M.S., Howard, L.R. and Miller, J.C. Jr. : Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato(*Solanum tubersum*, L.). *J Food Sci.*, 60, 341-343 (1995)
4. Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H. and Higashio, H. : Phenolic antioxidants from the leaves of *corchorus olitorius* L. *J. Agric. Food chem.*, 47, 3963-3966 (1999)
5. Camir, M.E. and Dougherty, M.P : Added phenolic compounds enhance lipid stability in extruded corn. *J. Food Sci.*, 63, 516-518 (1998)
6. S. W. Choi, C. S. Kim, M. S. Choi, B. H. Kim, H. A. Kim, and D. S. Choi, : The study for antioxidative effects of *Acanthopanax sessiliflorus* extract as a new cosmetics ingredients using electron paramagnetic resonance, *J. Soc. Cosmat. Scientists Korea*, 31(1), 73 (2005)
7. 조수현 : Anti-Oxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Effect of roots of *Rhododendron mucronulatum*. 중앙대학교 의약식품 대학원 석사학위논문 (2006)
8. S. K. Karin, B. Peter, Q. Jutta, H. Gernot, M. Weijan, K. Lale, M. Christian, and W. Meinhard, : Photoaging of the skin from phenotype ta mechanisms, *Experimen. Gerontol.*, 35, 307 (2000)

9. Pavel, 1993 ; Gilcherst et al., 1993 ; Kaufman, 1991
10. 조문정 : A Study on the Antioxidant Nutrients Analysis and Antioxidative of *Adenophora remotiflora* and *Aster glehni* 덕성여자대학교 일반대학원 석사학위논문 (2001)
11. Morrissey Pa, O' Brien NM. : Dietary antioxidant in health and disease. *Int dairy Journal* **8** : 463-472 (1998)
12. Ferrari CKB, Torres EAFS. : Biochemical pharmacology of functional food and prevention of chronic disease of aging. *Biomed Pharn* **57** : 251-260 (2003)
13. H. J. Bu, H. J. Lee, E. S. Yoo, D. S. Jung, K. Z. Riu, and S. J. Lee : Antioxidant effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **35(4)** 338-345 (2004)
14. Chance B, Sies H, Boveris A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59** : 527-605 15 (1997)
15. 서선정 : Antioxidant Compounds in Various Speciality Rice and Antioxidant Activities on Their methanolic Extracts. 충북대학교 대학원 석사학위논문 (2005)
16. Kim SM, Cho YS, Sung SL. : The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extract. *Kor J Soc Food Scl Technol* **33** : 626-632 (2001)
17. Farang RS, Badei FM. : Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *JAOCS* **66** : 792, (1989)
18. Hanck, A. : The biochemical and physiological role of vitamin A and E and their interactions. *Acta Vitaminol Enzymol* **7** : 5-11 (1985)
19. Nishmura C and K. : Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant contents in retina of streptozotocin-induced diabetic rats : effect of vitamin A administration. *JPN J Pharmac* **37** : 365-372 (1985)

20. Hennekens CH, Mayrent SL, Willet W. : Vitamin A, carotenoids and retinols. *Cancer* **58** : 1837-1841 (1986)
21. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. : Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoid. *Ann NY Acad Sci* **669** : 7-20 (1995)
22. Tannenbaum SR, Wishnok JS. : Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Ann NY Acad Sci* **498** : 354-362 (1987)
23. Terrar J, Matsuskita S. : Quinine formation from benzo(A)pyrene by free radicals : effect of antioxidants. *Free Rad Biol Med* **4** : 205-208 (1988)
24. Buttris JL, Diplock AT. : The α -tocopherol and phospholipid fatty acid content of rat liver subcellar membranes in vitamin E and selenium deficiency. *Biochem Biophys Acta* **963** : 61-69 (1988)
25. 김동훈. 식품화학. 탐구당 (2001)
26. Branen, A. L. (1975). Toxicological and biochemistry of Butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**, 59-63.
27. Choe, S. Y. and Yang, K. H. : Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene(BHT) and Butylated hydroxyanisole(BHA). *Korea J. Food Sci. Technol.*, **14(3)**, 283-288 (1982)
28. Chang, S. S., Matatijasevic, B. O., Hsieh, O. A. L. and Hwang, C. H.(1977). Natural antioxidants rosemary and sage. *J. Food Sci.*, **42**, 1102.
29. Rhee, J. S. : Effect of methyl silicone, TBHQ and BHA / BHT on frying and storage stabilities of the vegetable salad oil in high density polyethylene bottles. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **10(2)**, 250-257 (1987).
30. Schafer, E. and Arnrich, L. : Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic

- acid. *J. Nutr.*, **144**, 1130 (1984).
31. 박정옥 : Antioxidative activities and active compounds in the root of turkestan rose (*Rosa rugosa* Thunberg var. *rugosa*) 목포대학교 대학원 석사학위논문 (2006)
 32. 고경식, 전의식. 한국의 야생식물. 일진사 (2003)
 33. 박종희. 한국약초도감. 신일상사 (2004)
 34. 박영미 : Study on screening of antioxidant substance from natural products. 건국대학교 농축대학원 석사학위논문 (2000)
 35. Fang Y. Z., Yang S., Wu G. : Free radical, antioxidant and nutrition. *Nutrition* **12** : 872-879 (2002)
 36. Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966-968 (1981)
 37. Yamamishi, T. In Worldtea. : Proceeding of Intemational Symposium on tea Science. *Shizuoka. Japan.* 1-11 (1991)
 38. Blois, M. S. *Nature* **26**: 1199-1200 (1958)
 39. 소은미 : Antioxidative activity Screening and Active Compounds Seperation of Pu-erh Tea 원광대학교 대학원 석사학위논문 (2006)
 40. Inkeda, N. and Fukuzume, K. : Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J.Japan Oil Chem. Soc.*, **26**, 343 (1977)
 41. Kato, H., Lee, I. E., Chyuen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. : Inhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem*, **51**, 1333-1338 (1987).
 42. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S Tannenbaum S. R., *Biochem.* **126**, 131-136 (1982)
 43. Laura Bravo. *Nutrition Reviews*, **56(11)** : 317-333 (1998)
 44. Cheng, Z. J., S. C. Kuo, S, C. Chan, F. N. Ko, and C. M. Teng. *Biochem. Biophys. Acta*, **1392** : 291-299 9 (1998)
 45. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugilhara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bul*, **25**, 19 (2002)

46. 김남경 : Studies on the anti-oxidative effect of the buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) extract and its protective role against Cadmium-mediated stress 강원대학교 대학원 석사학위논문 (2006)
47. Chung, S. Y.: Antioxidant nutrients and related biological activities of green yellow vegetable juice. Ph. D. thesis, Yonsei University. (1958)
48. Chung, S. K., Osawa, T., and Kawakishi, S. : Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 118 (1997)
49. Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T, Okuda T. : Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* **1**: 44-47 (1987)
50. M. H Yu., H. G. Im., H. J. Lee., Y. J. Ji and I. S. Lee. : Components and Their Antioxidative of methanol Extracts from Sarcocarp and Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korea J. Food Sci. Technol.*, **38(1)** 128-134 (2006)
51. Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, **26**, 1199-1200 (1968)
52. Ancerwicz, J., Migliavacca, E., Carrpt, P. A., Teata, B., Bree, F., Zini, R., Tillement. J. P., Labidalle. S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A. M., Crevat, A and Ridant, A. L. : Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical biology Medicine*, **25(1)**, 113-120 (1998)
53. H. J. Bu., H. H. Lee., E. S. Yoo., D. S. Jung., K. Z. Riu and S. J. Lee : Antioxidant Effects and Inhibitory Effect on NO Synthesis by Extracts of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **35(4)** : 338-345 (2004)
54. Yinrong Lu and L. Yeap Foo. *Food chemistry.* **75**, 197-202 (2001)
55. Willian, L : Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, **225**,

- 21-23 (1970)
56. Robert, T. A. : The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Ed. Agric.*, **26**. 1735-1760 (1975)
57. Hayashi, N. and Watanabe, K. : Fate of nitrate and nitrite in saliva and blood of monkey administered orally sodium nitrate solution, and microflora of oral cavity of the monkey. *J. Hyg. Soc. Japan*, **19**, 92-400 (1978)
58. Takagi, S. and Nakao, Y. : Effect of nitrate during curing. *J. Japan Soc. Food Sci. and Tech*, **18(1)**, 1-17 (1971).
59. 고수연 : HPLC Analysis and Antioxidant Effect of Flavonoids extracted from Citrus Peels. 제주대학교 일반대학원 석사학위논문 (2005)
60. Cheng, Z. J., S. C. Kuo, S. C. Chan, F. N. Ko, and C. M. Teng. *Biochem. Biophys. Acta*, 1392 : 291-299 (1998)
61. 하귀현 : 천연 항산화 성분 *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **8(2)**: 135-144. (1995)
62. 손미예, 김성희, 남상해, 박석규, 성낙주. 국내산 녹차 및 후발효차 추출물의 항산화 효과. *Journal Of Life Science*. **14(6)**: 920-924 (2004)
63. N. Y., J. H. Kim., G. S. Sim., B. C. Lee. and H. B. Pyo. : Effect of Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-1 from *Ligularia fischeri*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **32(3)** : 129-134 (2006)
64. J. C. Heo., J. Y. Park., S. M. An., J. M. Lee., C. Y. Yun., H. M. Shin., T. K. Kwon and S. H. Lee : Anti-oxidant and Anti-tumor Activities of Crude Extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Kor. J. Food. Presery.* **13(1)** : 83-87 (2006)
65. 이영진, 몸안의 활성산소를 제거하라., KBS 문화사업단 (1998)

VI. 부 록

구실잣밤나무(*Castaonpsis cuspidata* var.)는 제주도와 다도해의 여러 섬, 남쪽 난대 지방 해변 산지의 상록수림을 모밀잣밤나무, 종가시 나무, 붉가시 나무 등과 함께 구성하는 상록 교목이다. 높이는 15~20m이고 가슴높이 지름이 1m에 이르며, 국외로는 일본 난대 지방에 분포한다. 어린 가지는 갈색 또는 회녹색이며 작은 껍질눈이 많으며, 겨울눈은 긴 타원형이고 비늘조각은 2열로 서로 이어진다. 잎은 어긋나며 모밀잣밤나무보다 크고, 잎몸은 길이 5~15cm로 질이 두텁다. 암·수의 꽃이 같은 그루에 달리며 5~6월에 꽃이 피는데, 벌레로 가루받이가 되며 개화기에는 강한 향기가 난다. 수꽃이삭은 길이 8~12cm, 암꽃이삭은 1.5~1.8cm이다. 도토리(견과)는 흑갈색으로 좁은 난형, 끝이 뾰족하며 길이는 12~21mm로 다음해의 가을에 익는다. 각정이(각두)는 10층 내외인 동심원상의 둥근 테돌기에 회갈색의 잔털이 밀생하며 도토리를 완전히 싸고 있으나 익으면 끝이 3개로 갈라진다. 열매는 날로 먹거나 구워서 먹고, 떡에 넣어서 먹기도 하며, 관상용으로도 심는다. 모밀잣밤나무와 매우 비슷하나 나무껍질이 갈라지는 형질로서 쉽게 구별될 수 있다.³²⁾



Figure 17. The leaves and stems of *Castaonpsis cuspidata* var.

자주괴불주머니(*Corydalis incisa*)는 남부 지방의 숲속이나 산기슭에서 자라는 2년초 식물로, 국외로는 일본, 중국, 대만 등에 분포한다. 줄기는 곧게 서고 높이가 20~50cm이며 모가 진다. 잎몸은 2~3회 깊게 갈라진 3출 겹잎으로 길이가 3~8cm이며, 작은 잎은 다시 깊게 갈려져 밑부분이 썸기모양을 하고 있다. 꽃은 5월에 피고 자홍색이며, 길이는 대략 15~20mm 정도이고, 4개 꽃잎 중 윗부분의 것이 가장 크며, 뒷부분은 길게 머느리발톱으로 뻗어 있다. 수술은 6개이며 양체로 구분된다. 열매는 길이 15~20mm로 타원형의 짙은 녹색이며 씨는 매끄럽고 흑색이다. 뿌리를 비롯하여 모든 부분을 약재로 쓴다. 괴불주머니 종류는 현호색 종류와 달리 땅속에 덩이줄기가 생기지 않는다. 식물 이름은 꽃 모양이 괴불주머니 같고 자주색이기 때문이다.³²⁾



Figure 18. The leaves and stems of *Corydalis Incisa*.

애기달맞이(*Oenothera laciniata*)는 미국 중동 지역과 대서양 연안 건조한 모래땅에서 자라는 2년초로, 우리나라에서는 1977년 이래 제주도 삼방산 일대에서 그 귀화가 확인된 식물이다. 줄기는 땅을 기며 윗부분만이 위를 향하고, 길이 20~60cm이며, 선 잔털이 밀생한다.

잎몸은 다양하게 변화가 많은데, 가장자리는 깊게 또는 얇게 깃모양으로 갈라 지거나 물결모양을 이루는 것, 톱니모양인 것 등이 있다. 꽃은 6~10월에 걸쳐 피고, 지름은 2~3cm 정도이며, 윗부분은 잎겨드랑이에 1개씩 위를 향해 달리며, 저녁에 피었다가 아침에 지는 일일화이고 시들면 황적색으로 변한다. 꽃잎은 4개로 노란색이고 지름 1cm 내외이며, 꽃받침조각은 4개로 연한 녹색이다. 씨방은 길이 2cm정도이며, 대롱모양으로 털이 밀생하고 얇은 4개의 흠이 있다. 씨는 길이 1.2mm정도로 각이 지지 않고 매끄럽다.³²⁾



Figure 19. The leaves and stems of *Oenothera laciniata*.

큰천남성 (*Arisaema ringens*)은 유발(由跋)이라는 별명을 가지고 있으며, 식물 형태는 천남성과 비슷하지만, 잎이 2개가 대생(對生)하고 길이 15~26cm 정도의 엽병(葉柄)이 있으며, 소엽(小葉)은 3개이고 마름모 비슷한 넓은 난형이며, 길이 8~30cm, 너비 4~10cm로서 엽병(葉柄)이 없고 끝이 실처럼 가늘며 표면은 윤기가 있는 녹색이며 뒷면은 흰빛이 돈다. 생약으로 큰천남성의 근경(根莖)을 천남성(天南星)이라고 한다. 제주도와 남부지방, 다도해의 섬 지방, 중부지방의 해안산지(海岸山地)의 음지(陰地)에 주로 자생한다.³³⁾



Figure 20. The leaves and stems of *Arisaema ringens*.

광대나물 (*Lamium amplexicaule*)는 전국 각처의 습한 길가나 밭둑에서 자라는 2년초로 아시아와 유럽, 아프리카 북부, 북미 등 북반구의 거의 전역에 분포한다. 어린 순을 나물로 먹고, 민간에서는 풀 전체를 토혈과 코피를 멎게 하는데 사용한다. 줄기는 네모지고 밑부분에서 갈라져 뭉쳐나며 높이는 20~30cm이다. 잎은 마주나며 하부의 것은 긴 잎자루가 있으나, 중간부분 이상의 것은 잎자루가 없다. 잎몸은 길이나 폭이 각각 10~25cm, 콩팥 모양이나 윗부분의 잎은 밑부분이 줄기를 완전히 둘러싼다. 꽃은 4~5월에 피고 길이 20mm인 홍자색 입술모양의 꽃이 여러 개 잎겨드랑이에 조밀하게 돌려난다. 꽃받침은 길이 약 5mm로서 5개로 갈라져 끝이 날카롭게 뾰족하고 털이 있다. 꽃부리는 꽃받침과 함께 곧게 또는 비스듬히 서며 단힌꽃(폐쇄화)도 섞여 있다. 아랫입술은 3개로 갈라지고 잔털이 있다. 수술 4개 중 2개는 길며, 암술은 1개이다. 분과는 길이가 약 2mm이고 흰무늬가 있다. 한명은 보개초(寶蓋草)이다.³²⁾



Figure 21. The leaves and flower of *Lamium amplexicaule*.

밤나무(*Castanea crenata* var.)는 거의 전국 산야에서 자라는 낙엽 교목으로, 국외로는 일본에 분포한다. 산기슭이나 인가에 심기도 하며 자생종은 높이가 15~20m가량 된다. 나무껍질은 회색 또는 진한 회색으로 어느 정도 깊게 세로로 갈라진다. 어린 가지는 연한 녹색, 황갈색의 별모양 털이 산재하나 다음 해에 흑자색으로 되었다가 탈락하며, 회백색의 껍질눈이 산재한다. 겨울눈은 난형으로 2~3개의 짙은 홍갈색 비늘조각에 덮여 있다. 잎자국은 2열로 어긋나고 반원형, 관다발 흔적이 다수이나 뚜렷하지 않다. 잎은 길이 1~1.5cm이고, 앞면 주맥에만 털이 있다. 뒷면은 색이 연하며 전면에 걸쳐 부드러운 털이 있으나 나중에는 맥 위에만 남는다. 겉맥은 21~26쌍이고, 수꽃이삭은 길이 10~15cm로 곧게 위로 뻗으며, 암꽃은 2~3개가 수꽃이삭 밑부분에 모여 달린다. 꽃은 5월에 핀다. 열매인 견과는 예리한 가시가 돋은 총포엽에 싸여 있다. 열매의 크기나 수확량, 맛 등에서 다양한 품종이 있다.³²⁾



Figure 22. The leaves and flower of *Castanea crenata* var.

산국(*Chrysanthemum boreale*)은 전국적으로 산지나 숲가 또는 인가 주변에서 자라는 다년초이나 울릉도에는 분포하지 않는다. 국외로는 일본, 중국 북부, 동북부에 분포한다. 꽃은 진정·해독·소종 등의 효능이 있어 두통과 어지럼증에 사용한다. 관상용으로 심으며 어린순은 나물로 먹는다. 뿌리줄기가 짧고 줄기는 곧게 자라며, 높이 1~1.5m로, 윗부분에 많은 가지가 갈라진다. 잎은 어긋나고 잎자루는 길이 1~2cm이다. 잎몸은 길이 5~7cm이고 긴 타원형이며 깊게 5~6쌍으로 갈라지며, 뒷면에 털이 있다. 꽃은 9~10월에 피고 지름 1.5cm 정도의 노란색 머리모양 꽃차례가 여러 개 줄기나 가지 끝에 산방상으로 달리며, 허꽃은 1줄로 배열하고, 길이 5~7mm이다. 총포조각은 선모양 또는 좁은 긴 타원형이고, 3~4줄로 배열하며, 가장자리는 막질이다. 수과는 길이 1mm 정도이며 갓털이 없다.³²⁾



Figure 23. The leaves and flower of *Chrysanthemum boreale*.

약모밀(*Houttynia cordata*)은 울릉도와 제주도, 중부 지방 이남의 그늘진 습지에서 자라는 다년초로 울릉도 이외는 흔하지 않다.



Figure 24. The leaves and flower of *Houttynia cordata*.

국외로는 일본, 대만, 중국, 히말라야에 분포한다. 꽃이 피기 전의 식물체를 이노

제와 구충제로 사용하고, 잎을 짓찧어 종기와 독충에 물렸을 때 바른다. 민간에서는 부스럼·화농·치질에 사용하고, 한방에서는 식물체를 임질·장염·요로감염증·폐렴·기관지염에 사용한다. 잎이 메밀의 잎과 비슷하고 약용식물이므로 약모밀이라고 부른다. 식물 전체에 독특한 악취가 있고, 줄기는 높이 15~50cm, 잎과 더불어 털이 없다. 잎은 어긋나고 잎몸은 길이 3~8cm, 폭 3~6cm, 끝이 길게 뾰족하고 가장자리는 밋밋하다. 잎자루는 길이 2~4cm, 턱잎이 있다. 6~7월에 수술 3개와 암술 1개의 꽃이 원뿔모양으로 모여 줄기 끝에 이삭모양으로 꽃차례를 이루어 핀다. 꽃잎처럼 보이는 2개의 흰색 총포조각이 꽃차례 밑부분에 십자모양으로 달리고, 열매는 삭과이며 3개로 갈라진다.³²⁾

산딸나무(*Cornus kousa*, Japanese strawberry tree, Kousa dogwood)는 황해도 이남으로 경기·충청도와 영·호남 지방, 제주도의 산지에서 자라나는 낙엽 교목으로, 국외로는 일본 및 중국에 분포한다. 높이 8m 정도에 이르며, 거의 수평으로 가지가 뻗는다.



Figure 25. The leaves and flower of *Cornus kousa*.

잎은 마주나고, 잎자루는 길이 4~10cm, 잎몸은 길이 5~10cm로 4~5개의 결맥이 뻗으며, 가장자리에 물결모양의 얇은 톱니가 있거나 거의 밋밋하다. 뒷면에 흰털이 밀생하고, 결맥 부분에 갈색털이 있다. 6월에 연한 녹색 꽃이 여러 개 머

리모양 꽃차례로 달리며, 길이 3~9cm, 폭 2~3cm의 백색 또는 담황색 총포조각 1개가 꽃잎같이 보인다. 열매는 육질의 집합과(취과)이고, 지름 1~1.5cm이며, 10월에 붉게 익는데 먹을 수 있다. 씨는 길이 4~6mm의 타원형이다.³²⁾

곰취(*Ligularia fiacheri.*)는 제주도를 포함하여 전국 깊은 산지의 냇가나 습지에서 자라는 대형의 다년초로 국외로는 일본, 중국, 시베리아 동부, 사할린, 히말라야에 분포한다. 어린잎을 나물로 먹는데, 독특한 향미가 있다. 한방에서는 가을에 뿌리줄기를 캐서 말린 것을 호로칠(胡蘆七)이라 하여, 해수·백일해·천식·요통·관절통·타박상 등에 처방한다. 줄기는 곧게 서고 높이 1~2m이다. 뿌리에서 난 잎은 특히 크며, 잎몸은 길이나 폭이 각각 30~40cm로 콩팥모양의 심장형이며, 가장자리에 톱니가 있고, 잎자루는 약 60cm이다. 줄기잎은 흔히 3개이며, 잎자루 밑부분은 잎집으로서 줄기를 싼다. 7~10월에 길이 10cm 정도의 술모양 꽃차례에 대롱꽃과 혀꽃으로 이루어지고 지름은 4~5cm, 노란색 머리 모양꽃이 달린다. 꽃차례의 자루마다 1개 포엽이 있다. 혀꽃은 5~9개, 대롱꽃은 20개 내외이다. 총포는 길이 10~12mm, 총포조각 8~9개가 1줄로 배열한다. 열매는 길이 6~10mm의 원기둥모양의 수과이며, 갓털은 갈색 또는 자갈색이고, 길이가 6~10mm이다.³²⁾



Figure 26. The leaves and flower of *Ligularia fiacheri.*

떡쭈(Gnaphalium affine)은 괴쭈 · 솜쭈이라고도 하고, 발독이나 별이 잘 드는

길가에서 전국에 걸쳐 자라는 2년초로, 국외로는 일본, 중국, 인도차이나, 말레이시아, 인도에 분포한다. 한방에서 뿌리를 제외한 식물체 전체를 서국초(鼠麴草)라는 약재로 쓰는데, 해수 · 가래 · 천식 · 기관지염 · 감기몸살에 효과가 있고, 근육통 · 요통 · 관절염 · 위궤양 · 피부가려움증에도 사용하며, 혈압을 떨어뜨리는 작용도 한다. 줄기는 곧게 서고 높이 20~30cm, 식물체는 흰솜털로 덮여 있으며, 밑부분에서 가지가 갈라진다. 잎은 주걱모양, 길이 3~6cm, 폭 5~10mm, 가장자리가 밋밋하고 잎자루가 없다. 뿌리에서 난 잎은 꽃이 필 때 말라 죽는다. 꽃은 5~6월에 핀다. 노란색의 대롱꽃만인 머리모양 꽃차례가 조밀하게 산방꽃차례를 이룬다. 총포는 3줄로 배열되고 길이 3.5mm 정도로서 종모양이며, 중심부에는 양성꽃, 둘레에는 수꽃이 배열한다. 열매는 수과로, 길이 0.5mm이며, 2.2mm 정도인 황백색의 갯털이 있다.³²⁾



Figure 27. The leaves and flower of *Gnaphalium affine*.

ABSTRACT

Screening for Antioxidant Activity of Jeju Native Plant

Jang, Hyun-Ju

Chemistry Education Major

Graduate School of Education, Jeju National University

Jeju Korea

Supervised by Professor Lee, Sun-Joo

This study was performed to evaluate the antioxidant activity of Jeju native plants 11 species (*Castaonopsis cuspidata* var., *Corydalis Incisa* Pers., *Oenothera laciniata*, *Arisaema ringens* Schott., *Lamium amplexicaule* L., *Castanea crenata* var., *Chrysanthemum boreale* Makino., *Houttynia cordata* Thunb., *Japaneses Strawberry Tree*, *Ligularia fiacheri* Tuczanihov., *Gnaphalium affine* D.) studies shows that the concentrations of total polyphenol, DPPH free radical scavenging, nitric oxide inhibition, xanthin oxidase inhibition, superoxide scavenging, hydroxyl radical scavenging activity. In general, the extracts of Jeju native plants 8 species(*Castaonopsis cuspidata* var., *Oenothera laciniata*, *Castanea crenata* var., *Chrysanthemum boreale* Makino., *Houttynia cordata* Thunb., *Japaneses Strawberry Tree*, *Ligularia fiacheri* Tuczanihov., *Gnaphalium affine* D.) showed higher antioxidant activities for fractionation of methanol extract of each sample and to evaluate the antioxidant activity in the same way.

* A thesis submitted to the Committee of the Graduste School of Education, Jeju National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Education in August 2007.

The concentrations of total polyphenol in methanol extracts of were determined by colorimetric methods. In the result, the polyphenol concentrations of methanol extracts were 283 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for *Japaneses Strawberry Tree.*, solvent Butanol extracts were 712 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for *Castanea crenata var.*

High activities of DPPH free radical scavenging, the IC_{50} values of methanol extracts from *Ligularia fiacheri Tuczaninov.* were 8.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ethyl acetate extracts from *Castaonpsis cuspidata var.* and Butanol extracts from *Oenothera laciniata* showed strong scavenging effect on DPPH free radical, the IC_{50} values of solvent extracts were 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively while those of Vitamin C was 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Nitric oxide inhibition of Jeju native plants showed lower activities, but in *Castanea crenata var.* showed higher than of Jeju native plants. Methanol extracts were 55% and Ethyl acetate extracts were 85%, respectively while those of quercetin was 77%.

The antioxidative effect of Methanol extracts from *Japaneses Strawberry Tree.* and Ethyl acetate extracts from *Castanea crenata var.* showed strong inhibition on xanthin oxidase. The IC_{50} values of from the extracts were 59 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively while those of allopurinol was 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The antioxidative effect of Methanol extracts and Ethyl acetate extracts from *Castaonpsis cuspidata var.* showed strong scavenging effect on superoxide. The IC_{50} values of from the extracts were 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively while those of allopurinol was 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Hydroxyl radical scavenging activity of Methanol extracts were 74% from *Castanea crenata var.* and Butanol extracts were 76% from *Castaonpsis cuspidata var.* were also higher than of Jeju native plants.

The result of this study that Jeju native plants for antioxidant activity were considered to have preventive effects for the chronic disease associated with ROS attack. Therefore, with more researches on identification, anti-inflammatory mechanism, anti-cancer mechanism and anti-aging mechanism, the Jeju native plants are expected to be a naturel source for the ingrediients of funtional food related to antioxidative properties.

감사의 글

많은 기대를 가지고 대학원에 입학한지가 엇그제 같은데 어느덧 2년 반의 시간이 흘러 대학원 과정을 마치게 되었습니다. 대학원 과정 동안 좋은 일도 힘든 일도 참 많았지만 되돌아보면 저에게 많은 것을 느낄 수 있게 해준 소중한 경험이었던 것 같습니다. 그 동안 여러 교수님들께 배운 지식과 지혜들을 가슴 깊이 새기고 부족한 저를 믿고 응원해주신 모든 분들께 보답할 수 있는 사람이 되도록 노력하겠습니다. 오늘 이 결실이 있기까지 많은 격려와 도움을 주신 모든 분들께 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

본 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 지도로 이끌어 주신 이선주 교수님께 깊은 감사를 드리며, 논문의 심사를 위해 애써주시고 조언을 아끼지 않으신 정덕상 교수님과 김원형 교수님께도 감사드립니다. 그리고 따뜻한 격려로 지도해주신 강창희 교수님, 늘 관심 깊게 지켜봐 주신 이남호 교수님, 한결같이 미소를 지어 주시던 변종철 교수님, 여러 가지 조언을 해주시며 지도해주신 김덕수 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다.

그리고 실험을 할 수 있도록 실험을 가르쳐주신 김미량 선생님과, 대학원 생활과 논문이 완성되기까지 깊은 배려를 해주신 제주여자고등학교 과학 선생님들께 진심으로 감사의 인사를 전하고 싶습니다. 항상 웃으면서 힘든 일도 마다 하지 않는 종현 오빠, 여러 가지 조언을 해주신 동우 오빠, 함께 고생하며 어려움을 이겨냈던 승아 언니, 힘들 때나 기쁠 때나 아낌없는 조언을 해준 화숙 언니, 은경 언니, 미정 언니, 한나 언니, 성문 오빠, 장환 선생님께도 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 아울러 논문에 사진을 기재할 수 있도록 선뜻 허락해주시고 사진을 제공해주신 한라산국립공원의 신용만 선생님께도 깊은 감사를 드리며, 아낌없는 조언을 해준 준호 오빠와 미정 언니를 비롯한 TIC 연구실 선생님들께도 깊은 감사를 드립니다.

힘들고 지칠 때마다 옆에서 항상 응원해주고 용기를 잃지 않게 도와준 소중한 나의 친구들 혜순이, 수연이, 주현이, 지현이, 민정이, 현정이, 주리, 경아에게 항상 이해해줘서 고맙다는 인사와 함께 바쁘다는 핑계로 신경써주지 못해 미안한

마음을 함께 전하고 싶습니다. 멀리서 항상 응원해주시는 은주선생님과 늘 따뜻한 격려를 해준 은지언니, 민정언니, 선아언니, 승주언니와 실습 때 많은 힘이 되어준 민경이, 고은이, 은영이에게도 고마움을 전하며, 따뜻한 시선을 보내주신 저를 아는 모든 분들께 끝없는 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

끝으로 제가 이 자리에 있기까지 항상 사랑과 정성으로 저를 지켜봐 주시는 사랑하는 부모님께 감사드리며, 든든하고 씩씩한 형훈이와 우리 귀염둥이 선우와 함께 이 결실의 기쁨을 나누고 싶습니다.

저를 격려해주시고 응원해주시는 모든 분들의 건강과 행복을 기원하며...

2007년 6월
장 현 주



※ 본 연구는 아열대 생물 산업 및 친환경 농업 생명 산업 인력양성 사업단의 2006년 연구과제에 의해 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.