

St. John's wort(*Hypericum perforatum* L.)의 생리활성 효과

조영제* · 천성숙¹ · 윤소정 · 김정환

상주대학교 식품공학과, ¹영남대학교 식품가공학과

Biological activity of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)

Young-Je Cho*, Sung-Sook Chun¹, So-Jung Yoon and Jeung-Hoan Kim

Department of Food Engineering Sangju National University, Sangju 742-711 Korea

¹Department of Food Science & Technology Yeungnam University, Gyeongsan 712-749 Korea

Received October 18, 2004; Accepted January 25, 2005

The physiological activity of St. John's wort extracts were examined. Total phenol contents in the ethanol extracts ($246.0 \pm 10.5 \mu\text{g/ml}$) with St. John's wort leaf was higher than that in water extract ($237.4 \pm 13.2 \mu\text{g/ml}$). The electron donating ability in the water extracts and in the ethanol extracts were 95.0% and 95.2% respectively. Antioxidant protection factor of the ethanol extract was higher than that of the water extract. The water extract from St. John's wort leaves did not show an antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, but the ethanol extract revealed high antimicrobial activities such as 11 mm of clear zone in 100 $\mu\text{g/ml}$ of phenol content and 13 mm of clear zone in 150 $\mu\text{g/ml}$ of phenol content. The hot water extract showed an angiotensin converting enzyme inhibitory activity of 19.2%. The xanthin oxidase inhibitory activity of hot water and ethanol extract were very high, amounting to 84.8% and 100% respectively. The results suggested a possibility for developing the phenol compounds in St. John's wort as anti *Helicobacter pylori*, anti-oxidant and anti-gout agents.

Key words: St. John's wort, biological activity, *Helicobacter pylori*, angiotensin converting enzyme, xanthin oxidase

서 론

St. John's wort(*Hypericum perforatum*)는 원산지가 유럽, 서아시아인 불푸레 나무과에 속하는 다년초로서 약용식물로 활용되고 있으며, 주요 성분으로는 히페리신(hypericin), 히퍼포린(hyperforin), 정유, 플라빈, 탄닌 등이 있으며 이것들이 주로 생리활성 효과를 나타낸다.¹⁾ 최근 연구에서 가벼운 우울증 치료에 효과가 있다는 것이 밝혀져 많이 이용되고 있으며, 우울증과 연관된 불안, 스트레스, 월경중후군, 만성피로, 만성통증과 같은 많은 신체적 조건의 개선에 도움이 될 수도 있다고 알려져 있다.²⁾

만성 위십이지장 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*는 1983년 Warren과 Marshall이 환자의 위 유문부로부터 분리하여 보고한³⁾ 이후 많은 연구가 이루어졌다. *H. pylori*의 정확한 오염경로나 전염원에 대하여서는 아직까지 정확히 증명된 바는 없지만 경구적 방법에 의하여 전달 감염되는 것으로 추정하고 있다. 우리나라 성인의 약 80% 정도가 이균에 감염되었으나 임상증상을 나타내지 않고 있다가, 어떠한 발

병촉진인자의 영향으로 만성적인 위십이지장 궤양을 유발하는⁴⁾ *H. pylori* 자체에 대한 연구와 병행하여 *H. pylori*에 대한 근본적인 예방이나 치료를 위한 새로운 방법이 시도 될 필요가 있다.

유지 또는 유지함유 식품의 산패는 주로 공기 중의 산소와 결합에 의해 일어나는데, 이때 유해산소로 알려진 활성산소가 발생하여 superoxide, hydroxy radical과 같은 free radical과 과산화수소가 생성되고, 이들은 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 질환을 일으키며, 생체기능을 저하시키고 노화 및 성인병 등의 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 이러한 산화 현상을 방지하기 위해 수많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나, 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제이다.⁷⁾ 그러나 최근 합성 항산화제의 유독성에 대한 많은 논의가 이루어지고 있으며,⁸⁻¹¹⁾ 천연으로부터 얻은 항산화제를 인공합성물에 대체하려는 시도가 많이 이루어지고 있다.^{12,13)}

고혈압 발생기작에서 renin-angiotensin system이 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다. Angiotensin converting enzyme (ACE)은 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I로부터 C-말단의 dipeptide를 가수분해시킴으로써 혈관수축 작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 nonapeptide인 bradykinin을 억제시킴으로써 결과적으로 혈압을

*Corresponding author

Phone: 82-54-530-5265; Fax: 82-54-530-5269

E-mail: yjcho@sangju.ac.kr

상승시키는 역할을 한다.¹⁴⁻¹⁸⁾ ACE저해작용을 갖는 peptide는 현저한 혈압강하 작용을 가지며,¹⁹⁻²¹⁾ ACE억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 식물 앞에서 분리한 phenolic 성 물질에 대한 ACE 저해활성이 연구되었다.^{22,23)}

Xanthine oxidase(XOase)는 생체 내 퓨린대사의 최종단계에 관여하는 효소로 xanthine 혹은 hypoxanthine으로부터 요산을 생성하여 혈장 내 요산이 증가되면 낮은 용해성으로 인하여 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍을 일으킨다.²⁴⁾ 통풍의 치료에 사용되는 약물로는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 alloxanthine이 있는데 allopurinol은 XOase에 강하게 결합하여 효소활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾

본 연구에서는 약용 식물로 활용되는 세인트존스워트를 성인병 예방을 위한 기능성 식품소재로 이용하기 위하여 세인트존스워트 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균효과, 항산화효과, 고혈압 예방 효과, 통풍억제효과 등의 생리 활성 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

시약. Butylhydroxytoluene(BHT), yeast extract, beef extract, pyruvic acid, β -carotene, H_2O_2 , linoleic acid, tween 40, α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH), xanthine oxidase(XOase), xanthine, angiotensin converting enzyme(ACE), hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL), hippuric acid 등은 Sigma사(USA)의 특급시약을 사용하였으며, Folin-ciocalteu시약, trichloroacetic acid(TCA), Na_2CO_3 , HCl 등은 일제 특급시약을 사용하였다.

추출물의 조제. 세인트존스워트 잎의 알콜추출액은 60% ethanol 70 ml에 세인트존스워트 건조잎 3g을 넣고 24시간 진탕 추출한 후 5,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였고, 열수추출액은 증류수 150 ml에 세인트존스워트 건조잎 3g을 넣고 액이 70 ml가 될 때까지 가열한 후 냉각하고 24시간 동안 교반 추출하고, 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 각각의 상정액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 여액을 시료로 사용하였다.

Phenol 화합물의 정량. 시료 1 ml를 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 가한 액에 넣은 후 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na_2CO_3 1 ml를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 표준곡선으로 양을 환산하였다.

***Helicobacter pylori* 배양.** 실험에 사용한 균주는 위, 십이지장궤양 원인균인 *H. pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 최적배지(액체배지 50 ml/당 special pepton 0.5 g, agar 0.75 g, NaCl 0.25 g, yeast extract 0.25 g, beef extract 0.2 g 및 pyruvic acid 0.025 g)를 사용하여 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO_2 incubator를 이용하였으며, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였고, agar plate상에서 배양은 37°C로 48-72시간 동안 실시하였다.

추출물의 *H. pylori* 항균활성 검색. *H. pylori* 최적배지 plate에 *H. pylori*균 100 μ l를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다

음, 멸균된 disc paper(ϕ 8 mm)를 올리고 0.45 μ m membrane filter로 제균한 각 추출물 100 μ l를 흡수시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미호기성 조건에서 24시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다.

전자공여능 측정. DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법²⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1 ml에 60 μ M DPPH 3 ml를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 (시료 첨가구의 흡광도 - 대조구의 흡광도)/대조구의 흡광도 \times 100으로 나타내었다.

Antioxidant protection factor(APF) 측정. APF는 Andarwulan과 Shetty의 방법²⁷⁾으로 측정하였다. 10 mg β -carotene을 50 ml의 chloroform에 녹인 용액 1 ml에 20 μ l linoleic acid, 184 μ l Tween 40과 50 ml H_2O_2 를 가하여 emulsion을 만들고, 5 ml의 emulsion에 시료용액 100 μ l를 혼합하여 vortex로 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 방치한 후 식혀주고, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. APF는 시료의 흡광도를 대조구의 흡광도로 나눈 값으로 나타내었다.

ACE 저해효과. ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법²⁸⁾에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질로 2.5 mM hippuryl-histidyl-leucine 용액 0.15 ml를 혼합하였으며, 대조구는 추출액 대신 동일 buffer 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N HCl 0.35 ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 ml의 EtOAc를 첨가하였다. EtOAc층만을 취한 다음 용매를 증류시킨 잔사에 2 ml의 증류수를 첨가하여 효소에 의해 기질로부터 분리되어 추출된 hippuric acid를 280 nm에서 흡광도를 측정정한 후 표준곡선에서 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(\frac{1 - \text{반응구의 hippuric acid 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}} \right) \times 100$$

XOase 저해효과. XOase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Crote²⁹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 3 ml에 효소액 0.1 ml와 시료 추출액 0.3 ml를 넣고 대조구에는 추출액 대신 증류수를 0.3 ml 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 20% TCA 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 요산의 함량을 292 nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(\frac{1 - \text{반응구의 요산 생성량}}{\text{대조구의 요산 생성량}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

세인트존스워트 추출물의 페놀성 물질 함량 측정. 페놀성 화합물은 식품계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, 이들은 phenolic hydroxyl 기

Table 1. Content of phenol in extracts from St. John's wort

Phenolic compounds as total phenol ($\mu\text{g/ml}$)	
Hot water extract	Ethanol extract
237.4 \pm 13.2	246.0 \pm 10.5

*This experiment repeated 6 times.

Table 2. Antioxidant activity of extracts from St. John's wort

DPPH (%)		Antioxidant protection factor (APF)	
Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
95.0 \pm 3.7	95.2 \pm 1.7	0.9 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1

*This experiment repeated 6 times.

Table 3. Inhibitory activity on *Helicobacter pylori* by extracts from St. John's wort

	Diameter of clear zone (mm)				
	Phenolic compounds as total phenol ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	50	100	150	200
Water extract	-	-	-	-	-
Ethanol extract	-	-	11.0 \pm 0.8	13.0 \pm 0.4	13.5 \pm 1.1

*This experiment repeated 6 times.

를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화, 항균생물 활성 효과 등의 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있어 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 조사하였다. 추출물의 phenol 함량을 측정할 결과 Table 1과 같이 열수 추출물은 237.4 \pm 13.2 $\mu\text{g/ml}$ 였으며, 알콜 추출물은 246.0 \pm 10.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 알콜 추출물의 phenol 함량이 다소 높게 나타났다. Clark 등³⁰⁾은 식물체에 함유된 페놀성 물질이 항균활성을 나타낸다고 보고하였는데, 세인트존스워트의 각 추출물에서는 페놀성 물질의 함량이 비교적 높게 나타나 천연 항균제 및 생리활성 물질로의 이용 가능성을 추측할 수 있었다.

세인트존스워트 추출물의 항산화 효과. DPPH 라디칼에 대한 소거 활성은 Table 2와 같이 열수추출물과 알콜추출물의 전자공여능이 95.0%, 95.2%의 값을 나타내었다. 강 등³¹⁾은 전자공

여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것 일수록 전자공여능이 높다고 하였다. DPPH는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 차이 측정이 가능하다. 따라서 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때는 DPPH 법이 편리하다고 알려져 있으나, 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH법의 적용에는 많은 경험이 요구된다. APF의 측정을 위하여 β -carotene을 첨가한 linoleic acid emulsion을 사용하여 세인트존스워트 추출물의 항산화력을 측정할 결과 Table 2에서와 같이 ethanol 추출군이 APF 1.8정도의 antioxidant protection factor를 나타내 지용성물질에 대한 항산화력이 높은 것으로 확인되었으나 열수 추출물의 경우 APF가 0.9로 지용성 물질에 대한 항산화력이 거의 없는 것으로 나타났다. Duval과 Shetty³²⁾는 pea에 함유되어있는 phenol성 물질의 APF가 1.1-1.3 정도였다고 보고한 것 보다 더 우수하였다.

세인트존스워트 추출물의 *H. pylori*에 대한 항균효과. *H. pylori*에 대한항균효과를 측정할 결과 Table 3에서와 같이 열수 추출물의 경우 clear zone이 관찰되지 않았으며, 알콜추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 11 mm의 clear zone이 나타나기 시작하여 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 13 mm의 clear zone이 관찰되어 저해활성이 높은 것으로 판단되었다.

항고혈압 효과. 일반적으로 phenol 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 단백질의 아미드 결합과 페놀성 수산기 간의 수소 결합에 의한 반응으로 단백질과 복합체의 침전물을 형성하며, 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 phenol 농도에 의한 상호작용으로 비경쟁적 효소를 저해함으로써 효소의 용해성 및 안정성을 저하시켜 효소의 불활성화를 일으키는 것으로 보고되고 있다.³³⁾ 추출물의 ACE에 대한 저해효과를 측정함으로써 항고혈압 효과를 살펴본 결과 Table 4와 같이 열수추출물에서 만 19.2%의 ACE에 대한 저해력을 나타내어 고혈압의 예방 효과는 비교적 낮은 것을 알 수 있었다.

항관절염 효과. 통풍(gout)의 발생기작에 관여하는 XOase에 대한 추출물의 억제 효과를 살펴 본 결과 Table 5에서와 같이 열수추출물은 84.8%, 알콜추출물은 100%의 완벽한 저해효과를

Table 4. Effect of inhibition on angiotensin converting enzyme by extracts from St. John's wort

Inhibition on angiotensin converting enzyme					
Control		Water extract		Ethanol extract	
Hippuric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)	Hippuric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)	Hippuric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)
9.4 \pm 0.3	0	7.6 \pm 0.6	19.2	9.5 \pm 0.4	0

*This experiment repeated 6 times.

Table 5. Effect of inhibition on xanthin oxidase by extracts from St. John's wort

Inhibition on xanthin oxidase					
Control		Water extract		Ethanol extract	
Uric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)	Uric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)	Uric acid ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory activity (%)
32.2 \pm 2.7	-	4.9 \pm 1.2	84.8	0	100.0

*This experiment repeated 6 times.

나타내어 XOase에 대한 높은 저해효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 세인트존스워트에 함유된 phenol성 물질은 gout의 예방 또는 생약 치료제로서의 이용 가능성이 매우 높다고 할 수 있겠다.

초 록

St. John's wort를 성인병 예방을 위한 기능성 식품소재로 이용하기 위하여 추출물의 생리활성효과를 조사하였다. 추출물의 phenol 함량은 열수추출물이 $237.4 \pm 13.2 \mu\text{g/ml}$ 였으며, 알콜추출물은 $246.0 \pm 10.5 \mu\text{g/ml}$ 로 알콜추출물의 phenol 함량이 다소 높게 나타났다. 추출물의 항산화효과는 DPPH가 열수추출물과 알콜추출물이 각각 95.02%, 95.24%로 높게 나타났고, antioxidant protection factor는 알콜추출물이 PF 1.78정도로 지용성물질에 대한 항산화력도 높은 것으로 확인되었으나 열수추출물의 경우 지용성 물질에 대한 항산화력이 거의 없었다. *Helicobacter pylori*에 대한 추출물의 항균활성은 열수추출물의 경우 clear zone이 나타나지 않았으며 알콜추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 11 mm와 13 mm의 clear zone이 관찰되어 저해활성이 높은 것으로 판단되었다. Angiotensin converting enzyme 저해효과는 열수추출물에서만 19.15%의 angiotensin converting enzyme에 대한 저해력을 나타내어 고혈압의 예방 효과는 비교적 낮았다. Xanthin oxidase에 대한 억제효과는 열수추출물이 84.79%, 알콜추출물이 100%의 완벽한 저해효과를 나타내어 xanthin oxidase에 대한 높은 저해를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 St. John's wort는 *Helicobacter pylori*에 대한 항균제, 항산화제 및 anti-gout 소재로의 개발이 기대되었다.

Key words: St. John's wort, *Helicobacter pylori*, xanthin oxidase, angiotensin converting enzyme

참고문헌

1. Beaubrum, G. and Ray, G. (2000) A review of herbal medicines for psychiatric disorders. *Psychiatr. Serv.* **51**, 1130-1140.
2. Chatterjee, S. S., Bhattacharya S. K., Wonnemann M., Singer A. and Muller W. E. (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* **6**, 499-540.
3. Warren, J. R. and Marshall, B. J. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1273-1275.
4. Baik, S. C., Kim, J. B., Cho, M. J., Kim, Y. C., Park, C. K., Ryou, H. H., Choi, H. J. and Rhee, K. H. (1990) Prevalence of *H. pylori* infection among normal Korean adults (in Korean). *J. Dorena SOC. Microbiol.* **25**, 455-462.
5. Hatano, T. (1995) Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols. *Natural Med.* **49**, 357-363.
6. Masaki, H., Sasaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. (1995) Active oxygen scavenging activity of plants extracts. *Bull. Pharm.* **18**, 162-166.
7. Haumann, B. F. (1990) Antioxidants: Firms seeking products they can label as 'natural'. *Inform.* **1**, 1002-1005.
8. Farag, R. S., Badei, A. Z. M. A. and Baroty, G. S. A. (1989) Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. *JAOCS* **66**, 800-805.
9. Baranen, A. L. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS* **52**, 59-63.
10. Farag, R. S., Ali, M. N. and Taka, H. S. (1990) Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *JAOCS* **68**, 188-192.
11. Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735-743.
12. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. (1988) Antioxidants activities of edible plants. *Jpn. J. Food Ind.* **35**, 22-28.
13. Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-974.
14. Soffer, R. L. (1976) Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 73-77.
15. Ondetti, M. A. and Cushman, D. W. (1982) Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 283-291.
16. Douglas, W. W. (1980) Chapter 27, The plasmacological basis of therapeutics (6th ed) Gilman A. G., Goodman L. S. and Gilman A. (eds.) *McMillian Publishing Co., Inc.* New York.
17. Hollenberg, N. K. (1979) Pharmacologic interruption of the renin-angio tensin system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **19**, 559-565.
18. Cushman, D. W. and Ondetti, M. A. (1980) Inhibitor of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1871-1876.
19. Stewart, J. M., Ferreira, S. H. and Greene, L. J. (1971) Bradykinin potentiating peptide pca-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1557-1563.
20. Gavras, H., Brunner, H. R., Laragh, J. H., Sealey, J. E., Gavras, I. and Vukovich, R. A. (1974) An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstriction and volume factors in hypertensive patients. *New Engl. J. Med.* **291**, 817-821.
21. Case, D. B., Wallace, J. M., Deim, H. J., Weber, M. A., Drayer, J. I. M., White, R. P., Sealey, J. E. and Laragh, J. H. (1976) Estimating renin participation in hypertension: Superiority of converting enzyme inhibitor over saralasin. *Am. J. Med.* **61**, 790-794.
22. Petrillo, E. W. and Ondetti, M. A. (1982) Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Medicinal chemistry and biological actions. *Med. Chem. Biol. Act. Med. Res.* **2**, 1-5.
23. Wyvratt, M. J. and Patchett, A. A. (1985) Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Med. Res. Rev.* **5**, 483-488.
24. Storch, J. and Feber, E. (1988) Detergent-amplified chemiluminescence

- of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **169**, 262-267.
25. Lehninger, A. L. (1988) Principles of Biochemistry. (1st ed.) Worth Publishers Inc., New York.
26. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
27. Andarwulan, N., Fariaz, D., Wattimena, G. A. and Shetty, K. (1999) Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3158-3163.
28. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. and Ondetti, M. A. (1977) Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* **16**, 5484-5488.
29. Strip, F. and Crote, E. D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3858.
30. Clark, A. M., El-Feraly, F. S. and Li, W. S. (1981) Antimicrobial activity of phenolic constituents of *magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **70**, 951-952.
31. Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. R. and Moon, K. D. (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 978-984.
32. Duval, B. and Shetty, K. (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J. Food Biochem.* **25**, 361-377.
33. Funayama, S. and Hikono, H. (1979) Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 2865-2869.