

산사(*Crataegi Fructus*) 추출물로부터 α -amylase와 α -glucosidase 저해 물질 분리 및 동정

김정환* · 김명욱¹ · 조영제²

엔아이피 바이오텍, ¹경북해양바이오 산업연구원, ²상주대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Inhibitory Compound from *Crataegi Fructus* on α -amylase and α -glucosidase

Jeung-Hoan Kim*, Myung-Uk Kim¹ and Young-Je Cho²

NIP Biotech, Munkyeong 745-706, Korea

¹Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry, Uljin 767-801, Korea

²Department of Food Engineering Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

Received March 28, 2007; Accepted July 2, 2007

The objective of this research was to evaluate the inhibitory activities of phenolic compounds isolated from *Crataegi Fructus* on α -amylase and α -glucosidase. The content of total phenolic compounds of water extract from *Crataegi Fructus* was 22.5 mg/g. The inhibitory activity of the water extract (200 μ g/ml) from *Crataegi Fructus* on α -amylase and α -glucosidase was determined to be 100% and 82.6%, respectively. Isolation of inhibitory compounds was carried out on Sephadex LH-20 and MCI-gel CHP-20 column chromatography using a gradient elution procedure of increasing MeOH in H₂O. The chemical structure of the inhibitory compound against α -amylase and α -glucosidase was confirmed as chlorogenic acid by spectroscopic analysis of FAB-MS, NMR and IR spectrum.

Key words: α -Amylase, *Crataegi Fructus*, α -glucosidase, MCI-gel CHP-20, Sephadex LH-20

서 론

최근 경제 성장과 평균 수명의 연장으로 현대인들의 질병과 고령화 사회에 따른 삶의 질에 대한 인식이 변하고 있으며, 그에 따라 항균, 항산화, 항암 및 면역 강화 활성 등의 생리활성을 갖는 천연물질에 대한 관심이 높아지고 있다.¹⁾ 식물에 존재하는 생리활성 물질의 대부분은 페놀성 화합물이고 이들 페놀성 화합물들은 플라보노이드류가 주를 이루고 단순한 페놀류, 페놀산, 페닐프로판노이드류, 페놀성 퀴논류들을 포함하는 것으로 항세균, 항알레르기, 항산화, 항종양, 항암, 충치방지, 심장질환 및 당뇨병 예방 등의 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다.²⁾ 1985년 세계보건기구의 분류에 따라 당뇨병은 인슐린 의존형, 인슐린 비의존형 및 인슐린 요구형 등 3가지로 나눌 수 있다. 박 등³⁾은 1995년 세브란스 병원의 통계자료에 따르면 우리나라에서는 식생활 등 생활습관에 따라 인슐린 작용이 낮거나 분비가 부족하여 발병하는 인슐린 비의존형 당뇨병 환자가 91.9%

이며 주로 40세 이후에 많이 발생하는 특징이 있다고 보고하였다. 또한 역학적인 연구에 따르면 전통적인 생활방식을 고수하는 지역의 주민에게서 인슐린 비의존형 당뇨병의 발생률이 낮고, 개발도상국에서 선진국으로 이민한 사람에게서 발생률이 현저히 증가하는 것으로 밝혀졌다.⁴⁾ 우리나라 당뇨 환자의 대부분인 인슐린 비의존형 당뇨병 치료약물에 대한 연구는 당의 소화 및 흡수를 제어할 목적으로 α -amylase 저해제에 대한 연구가 진행되고 있다.^{5,6)} α -Amylase는 탄수화물의 α -D-(1,4)-glucan 결합을 분해하는 효소로서 사람, 동물, 미생물, 곤충 등의 탄수화물 대사에 필수적인 효소이다. 그러나 당뇨, 비만, 과혈당증 등 탄수화물과 관련된 질병 치료를 위한 식물에서 보고된 α -amylase 저해제는 밀, 보리, 두류식물^{7,10)} 등에서 유래한 것으로 당 단백질과 관련된 물질이 대부분이고, 일부 한약재와 미생물을 대상으로한 연구가^{11,12)} 있을 뿐 식물 유래의 저해물질에 대한보고는 미흡한 형편이며 당뇨병 예방적인 차원에서는 천연물을 이용한 항당뇨 식이의 개발은 전무한 실정이다.

본 연구에서는 한약재로 사용되어온 산사 추출물로부터 phenolic compound를 분리하여 α -amylase와 α -glucosidase 저해 효과를 탐색하여 기능성 식품 소재개발의 기초 자료를 얻고자 하였다.

*Corresponding author
Phone: 82-54-552-0890; Fax: 82-54-530-5269
E-mail: kjhs97@hanmail.net

재료 및 방법

시약 및 실험장치. 분리한 물질의 화학구조 해석을 위해 Infrared Spectrum(Perkin-Elmer IR-1330, USA), Nuclear Magnetic Resonance(Bruker AM-300, Japan), Spectrophotometer(Unicam UV-vis. Japan), Mass Spectrometer(Jeol JMS-PX 300, Japan), Polarimeter(Jasco, DIP-370, Japan)이다. 물질 분리 정제를 위해 층진제 로써 Sephadex LH-20(Pharmacia, Co., Sweden), MCI gel CHP 20(75~150 μ m, Mitusbish Chemical Ind. Co., Ltd., Japan)을 사용하고, TLC plate(Silica gel with 254 nm, Fluorescent indicator on polyester, Aldrich, Co., German)도 사용하였다. Soluble starch는 Duksan사에서, α -glucosidase는 Fluka사에서 각각 구입하였다. 시료의 페놀 분리에 사용한 HPLC는 Waters 2690 separations Module과 2487 UV detector를 사용하였고 이동상으로서 acetonitrile은 J.T.Baker사의 HPLC급을 사용하였고, 그 외 formic acid, folin-ciocalteu 시약, trichloroacetic acid(TCA), Na_2CO_3 등은 특급시약을 사용하였다.

시료의 선정. 본 실험에서 사용한 산사는 2006년 3월 대구 약령시장에서 구입하여 40 mesh로 분쇄한 후 추출용 시료로 사용하였다.

추출물의 조제. 시료 추출은 물 추출군의 경우 증류수 200 ml에 산사 1 g을 넣어 100 ml로 줄어든 때까지 가열한 후 냉각하였고, 알코올 추출군으로 60% ethanol 100 ml에 산사 1 g을 넣어 각 추출군을 24시간 진탕 후 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 각각의 상정액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 추출물 시료를 얻었다.

Phenol 화합물 정량. 시료 1 ml에 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어준 후 5분간 방치하고, Na_2CO_3 1 ml를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하였으며 gallic acid를 이용한 검량곡선으로부터 총 phenol 화합물의 양을 환산하였다.¹³⁾

α -Amylase 저해 활성 측정. α -amylase 저해 활성 측정은 agar diffusion method를 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ plate는 5 g의 agar와 5 g의 soluble starch를 500 ml 증류수에 녹인 후 121°C, 15분간 감압 살균하고 15 ml씩 분주하여 제조하였고, 대조구의 경우 0.8 μ l의 증류수 0.2 μ l의 효소(1000 Unit/ml)를 섞고 반응구는 증류수 대신 산사 추출물을 효소와 섞어 plate에 놓인 disc paper 위에 각각 분주하고 37°C에서 3일간 배양한 후 I_2/KI (5 mM I_2 in 3% KI) 5 ml를 가하여 15분간 발색 후 다음의 식으로 효소 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{[\text{대조구의 면적} - \text{반응구의 면적}]}{\text{대조구의 면적}} \times 100$$

α -Glucosidase 저해 활성 측정. α -glucosidase 저해 활성 측정하기 위하여 Tibbot 등¹⁵⁾의 방법에 따라 반응 혼합액은 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 ρ -nitrophenol- α -D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 기질을 만들었다. 기질 1 ml와 효소액 0.1 ml를 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 ml, 반응구에는 시료 0.1 ml를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후

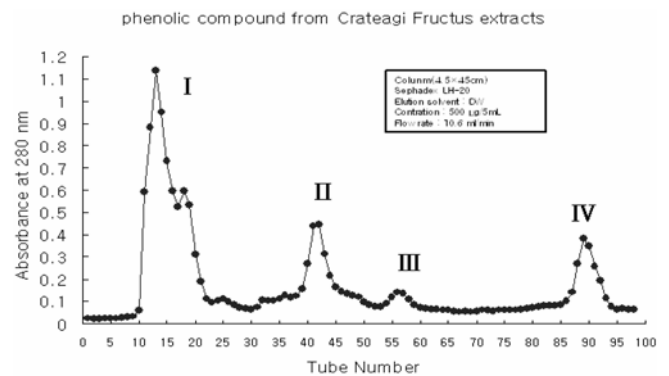


Fig. 1. Purification of phenolic compound from *Crataegi Fructus* by Sephadex LH-20 column chromatography.

1 N-NaOH 0.1 ml를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 ρ -nitrophenol(PNP)은 400 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, 그 양은 표준물질 ρ -nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{반응구의 PNP 생성량} / \text{대조구의 PNP 생성량})] \times 100$$

α -Amylase 및 α -glucosidase 저해활성 물질의 분리. 건조된 산사 5 kg에 물을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(5000 rpm, 30 min)하여 상정액과 침전물을 얻었고 같은 추출과정을 3회 반복하였다. rotary evaporator로 농축여과한 농축액은 Fig. 1과 같이 Sephadex LH-20(5×45 cm) column에 loading하고 H_2O 를 용출용매로 하여 I, II, III, IV로 분획하였다. 각 분획물은 농축한 다음 α -amylase와 α -glucosidase 저해활성을 측정하여 저해력이 높은 분획물을 선택하여 다시 Sephadex LH-20(5×45 cm)와 MCI-gel을 이용하여 2차 분획을 하였다. 이 분획물 들을 silical gel TLC plate(5.0×5.0 cm)로 benzen: ethylformate: formate(1:7:1, v/v/v)의 용매를 사용하여 전개한 다음, $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 발색시약을 분무한 후 70°C 부근에서 발색 시켜 phenol compound의 분리 정도를 확인 하였다.¹⁶⁾

Phenol compound의 물리 및 화학적 성질. 분리된 물질의 용해점은 시료 1 mg을 취하여 미량용점 측정 장치를 이용하여 측정하였으며, $[\alpha]_D$ 는 시료 5 mg을 Me_2O 및 MeOH에 용해하여 polarimeter로 측정하였다. IR spectrum은 할로겐화 알칼리 정제법을 이용하였으며, NMR spectrum은 순수 정제물 10 mg을 측정 용매 DMSO에 용해시키고 TMS를 기준 물질로 하여 PMR(250 MHz)로 측정하였다. 또한 Mass Spectrum 측정은 고체 시료 1 mg을 감압상태(10^{-4} ~ 10^{-6} mmHg)에서 negative ion FAB-mass spectrum을 이용하여 화학적 분석법에 의해 측정하였다. 이때 측정 용매로서는 thioglycerol을 사용하였으며 측정 조건에서 emitter 전류는 22~28 eV이며, 이온원의 가속가압이 6~7 kV에서 질량분석을 하였다. 원소 분석은 분석 시료 1 mg을 취해 48시간 감압 건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동 원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, O는 분자량을 기준으로 계산치에 의해 환산하였다.¹⁷⁾

Table 1. Content of total phenol in water and 60% ethanol extracts from *Crateagi Fructus*

Contents of Phenol (mg/g)	
Water extracts	60% Ethanol extracts
22.5±0.35	19.2±0.20

Each value represents the mean±SD (n = 6).

결과 및 고찰

페놀성 화합물의 함량. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대분자들과 쉽게 결합하는 특성이 있으며, 항산화, 항미생물 활성효과 등의 생리활성 기능을 나타낸다.¹⁸⁾ 본 연구에서 페놀성 화합물의 함량을 조사한 결과, Table 1과 같이 물 추출물에서 22.5 mg/g, 에탄올 추출물에서 19.2 mg/g의 페놀 함량을 나타내었다. 김 등¹⁹⁾이 메탄올 추출물에서 녹차(10.9 mg/g), 상황버섯(17.9 mg/g), 인진호(6.7 mg/g)의 페놀성 화합물을 함유한다고 보고한 것과 비교하면, 산사 추출물의 페놀화합물 함량이 비교적 높음을 알 수 있었다.

α-Amylase 저해효과. 탄수화물 대사 작용에 필수적인 효소인 α-amylase에 대하여 산사로부터 phenol성 물질함유 추출물 별로 비교하였다. 그 결과 Table 2와 같이 α-amylase에 대한 저해 효과는 물과 에탄올 추출물(200 µg/ml)에서 모두 100%의 저해율을 나타내었다. 김 등²⁰⁾은 조록나무 잎 부분에 2차 대사산물로서 안토시아닌, proanthocyanidins 등과 같은 phenol성 물질을 병원균이나 해충으로부터 자신을 보호하기 위해 다량 함유하고 있기 때문에 α-amylase 저해활성 효과가 있다고 하였으며, α-amylase에 대한 비교적 높은 저해효과를 나타낸 산사 추출물속의 phenol성 물질이 α-amylase 저해 활성을 나타내는 것으로 추측된다.

α-Glucosidase 저해효과. 산사 추출물을 효모기원의 α-glucosidase 활성저해 효과를 측정한 결과, Table 3과 같이 물 추출물(200 µg/ml)에서 82.6%의 저해율을 나타내었으며, 에탄올

Table 4. Concentration of phenolic compound of fraction from Sephadex LH-20 column chromatography

Fraction number	Phenol concentration (µg/ml)
I	115.20±0.14
II	8.64±1.02
III	3.84±0.39
IV	228.80±0.54

Each value represents the mean±SD (n = 6).

추출물(200 µg/ml)에서는 12%로 물 추출물보다 낮은 저해율을 나타내었다. Mitsunage 등²¹⁾은 일본잎갈나무 및 아카시아나무 수피로부터 분리한 proanthocyanidin(PA)이 치아 우식증의 원인이 되고 있는 GTase 효소 활성을 억제하는 것을 보고하였으며, 이 등²²⁾은 PA가 탄수화물과 관련한 효소의 일부 기능을 억제하고 있다고 보고하고 기존의 식물 유래의 α-amylase 억제물질은 대부분 단백질과 관련된 물질이나 PA는 phenol 계통의 물질로 α-amylase 및 α-glucosidase의 활성을 저해한다고 보고하였다. 이와 같이 산사 추출물의 phenol성 물질도 이러한 탄수화물 분해 효소의 활성을 억제하는 것으로 판단된다.

Sephadex LH-20에 의한 phenolic compound의 분리 및 정량. 산사의 α-amylase 및 α-glucosidase 억제물질을 정제하기 위하여 Sephadex LH-20 column을 사용하여 분획한 결과 Fig. 1과 같이 4개의 분획을 얻었다. 각 분획물의 페놀 함량을 측정 한 결과, Table 4와 같이 fraction I과 IV에서 115.2 µg/ml, 228.8 µg/ml로 분획 물 중 높은 페놀 함량을 나타내었다. 각 분획물 200 µg/ml의 농도로 α-amylase와 α-glucosidase 저해활성을 측정 한 결과 Table 5와 같이 fraction IV에서 α-amylase 저해활성은 95.7%, 그리고 α-glucosidase 저해활성은 92.6%로 분획물 중 가장 높은 저해활성을 나타내었다. Fraction I은 α-amylase 저해활성이 78.4%, fraction II는 80.6%, fraction III는 65.8%의 저해효과를 나타냈으나 α-glucosidase에 대한 저해활성은 각각 20.9%, 27.8%, 37.1%로 비교적 낮은 저해효과를 나타내었다. Hulme과 Johnes²³⁾ phenol성 물질을 함유한 식물 추출물을 분리할 경우 특정 분획물 내의 효소저해가 높았다고 보

Table 2. Inhibition of extracts from *Crateagi Fructus* on α-amylase activity

Fraction Number	Water extract		60% Ethanol extract	
	clear zone (cm ²)	Inhibition (%)	clear zone (cm ²)	Inhibition (%)
Control	12.2	-	12.2	-
<i>Crateagi Fructus</i>	0	100.0±0.00	0	100.0±0.00

Each value represents the mean±SD (n = 6).
Concentration of sample was 200 µg/ml.

Table 3. Inhibition of extracts from *Crateagi Fructus* on α-glucosidase activity

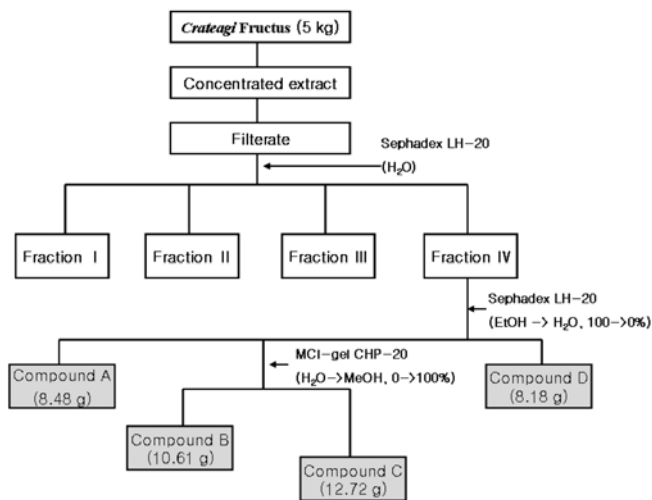
Fraction Number	Water extract		60% Ethanol extract	
	PNP (µg/ml)	Inhibition (%)	PNP (µg/ml)	Inhibition (%)
Control	35.4	-	35.4	-
<i>Crateagi Fructus</i>	6.1	82.6±1.25	31.2	12.0±0.68

Each value represents the mean±SD (n = 6).
Concentration of sample was 200 µg/ml.

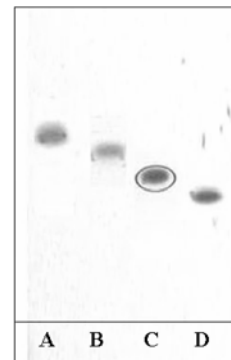
Table 5. Inhibitory activities of phenolic compounds fraction from Sephadex LH-20 on α -amylase and α -glucosidase

Fraction Number	α -amylase		α -glucosidase	
	glucose (μ g/ml)	Inhibition (%)	PNP (μ g/ml)	Inhibition (%)
Control	320.8		3.56	
I	69.3	78.4 \pm 0.24	2.81	20.9 \pm 0.12
II	62.2	80.6 \pm 0.84	2.57	27.8 \pm 0.99
III	109.7	65.8 \pm 0.25	2.24	37.1 \pm 0.37
IV	13.8	95.7 \pm 0.74	0.26	92.6 \pm 0.44

Each value represents the mean \pm SD (n = 6).
Concentration of sample was 200 μ g/ml.

**Fig. 2. A procedure for isolation of phenolic compound from *Crataegi Fructus*.**

고하였고, Cho 등²⁴⁾은 Sephadex를 이용해 polyphenol 류를 분획하면 phenol 류내 수산기의 수에 따라 분획되기 때문에 phenol류의 분리가 가능하다고 보고하였으며, 본 실험의 산사 추출물의 분획에서도 특정 분획물(fraction IV)에서 높은 효소저해가 확인되어 Hulme과 Johnes의 보고와 유사하였다.²³⁾ 1차 분획물을 Sephadex LH-20 dextran gel과 구조적 이성체 phenol 류 분리가 용이한 MCI-gel을 이용하여 normal phase type인 EtOH \rightarrow H₂O와 reverse phase type인 H₂O \rightarrow MeOH로 유기용매의 농도를 증가 시키며 용출 하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 4종류(comp. A~comp. D)의 화합물들을 분리하였는데, Table 6과 같이 분리된 모든 화합물에서 α -amylase에 대한 저해 활성이 20% 이상으로 나타났으며, 특히 comp. C에서 97.6%로 가장 높은 저해 활성을 나타냈다. 또한 α -glucosidase에 대한 저

**Fig. 3. Thin layer chromatography of compounds from *Crataegi Fructus*.**

해 활성을 측정한 결과 comp. C가 97.7%로 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. α -Amylase 및 α -glucosidase에 대한 저해 활성이 가장 우수한 comp. C의 구조를 분석한 결과, melting point가 208°C이고 비선광도는 $[\alpha]_D^{26} -35.2^\circ$ (c=2.8, MeOH), IR spectrum에서는 3450 cm^{-1} 에서 OH기, 1710 cm^{-1} 에서 카복실기(COO)의 signal이 각각 관찰되었고, negative FAB-ms spectrum에서 m/z 354[M]⁻를 확인하였다(Table 7). 시료 1 mg을 취해 48시간 감압 건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동 원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하여 O는 분자량을 기준으로 계산치에 의해 환산한 결과, C₁₆H₁₈O₉: C=54.24%, H=5.12%, O=40.64%로 나타났다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 1.98(2H, br d, H-5), 2.15(2H, m, H-6), 3.52(1H, br dd, J=2.9 and 8.3 Hz, H-4), 3.91(1H, br s, H-5), 5.08(1H, br d, H-3) 등의 quinic acid 구조에 유래한 signal들이 관찰되었고, caffeoyl moiety는 6.15(1H, d, J=15.8 Hz, H-8'), 6.77(1H, d, J=8.2 Hz, H-5'), 6.98(1H, dd, J=1.7 and 8.2 Hz, H-6'), 7.03(1H, d, J=1.7 Hz, H-2'), 7.42(1H, d, J=15.8 Hz,

Table 6. Inhibitory activities of phenolic compounds by MCI-gel CHP-20 on α -amylase and α -glucosidase

Compound	α -amylase		α -glucosidase	
	glucose (μ g/ml)	Inhibition (%)	PNP (μ g/ml)	Inhibition (%)
Control	320.8	-	3.56	-
A	239.6	25.3 \pm 0.24	2.25	15.3 \pm 2.65
B	222.6	30.6 \pm 0.77	2.72	23.6 \pm 0.74
C	7.7	97.6 \pm 1.36	0.08	97.7 \pm 0.37
D	228.7	28.7 \pm 2.04	2.56	28.2 \pm 1.24

Each value represents the mean \pm SD (n = 6).
Concentration of sample was 200 μ g/ml.

Table 7. Spectroscopic data of compound C

Type	A amorphous powder
FAB-MS (m/z)	[354.31]
polarity	$[\alpha]_D^{26} -35.2^\circ$ (c = 2.8, MeOH)
¹ H-NMR	1.98(2H, br d, H-5) 2.15(2H, m H-6) 3.52(1H, br dd, J = 2.9 and 8.3 Hz, H-4) 3.91(1H, br s, H-5) 5.08(1H, br d, H-3) 6.15(1H, d, J = 15.8 Hz, H-8') 6.77(1H, d, J = 8.2 Hz, H-5') 6.98(1H, dd, J = 1.7 and 8.2 Hz, H-6') 7.03(1H, d, J = 1.7 Hz, H-2') 7.42(1H, d, J = 15.8 Hz, H-7')
¹³ C-NMR	77.1(C-1), 38.2(C-2), 74.7(C-3), 72.9(C-4), 69.9(C-5), 39.2(C-6), 125.8(C-1'), 114.2(C-2'), 1.44.9(C-3'), 147.5(C-4'), 115.3(C-5'), 122.9(C-6'), 144.7(C-7'), 114.0(C-8'), 166.3(C-9'), 175.0(Carboxyl)

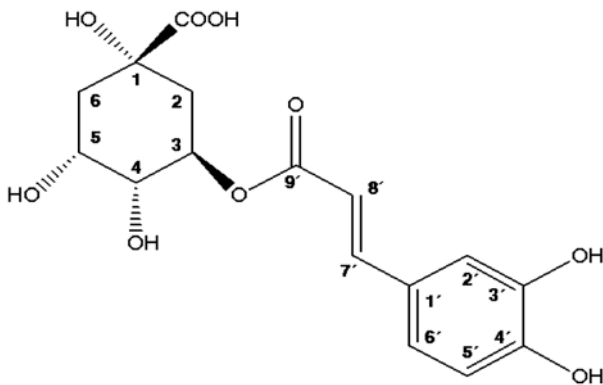


Fig. 4. Chemical structure of chlorogenic acid.

H-7') 등의 signal들이 관찰되어 Jin 등²⁵⁾이 보고한 결과와 일치하였기 때문에 compound C는 Fig. 4와 같은 구조를 가진 chlorogenic acid로 동정하였다.

초 록

산사 추출물로부터 α -amylase, α -glucosidase 저해활성을 탐색하고 Sephadex LH-20(5×45 cm)와 MCI-gel CHP-20를 이용하여 저해활성 물질을 정제하고 구조분석을 하였다. 산사 추출물의 페놀화합물의 함량은 물 추출물에서 22.5 mg/g, 60% ethanol 추출물에서 19.2 mg/g으로 나타났으며, 산사 물 추출물(200 μ g/ml)에서 α -amylase, α -glucosidase 저해활성이 각각 100%와 82.6%로 나타났으나, 60% ethanol 추출물(200 μ g/ml)에서는 α -glucosidase 저해활성이 12%로 낮은 저해활성을 나타내어 산사 물 추출물을 Sephadex LH-20를 이용하여 분획한 결과 I, II, III, IV의 4가지 분획물을 획득하고 다시 Sephadex LH-20과 MCI-gel을 이용하여 normal phase type인 EtOH \rightarrow H₂O와 reverse phase type인 H₂O \rightarrow MeOH로 유기용매의 농도를 증가 시키며 용출하여 A, B, C, D의 compounds를 얻었다.

4가지 compound 중 compound C(200 μ g/ml)가 α -amylase, α -glucosidase 저해활성이 각각 97.6%, 97.7%로 가장 높게 나타났으며, FAB-MS, NMR과 IR spectrum을 분석한 결과 chlorogenic acid로 동정되었다.

Key words: α -Amylase, α -glucosidase, *Crataegi Fructus*, Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20

참고문헌

- Park, S. Y. and Kim, J. W. (1992) Screening and isolation of the antitumor agents from medicinal plants (I). *Korean J. Pharmacogn.* **23**, 264-267.
- Huang, M. T., Ho, C. T. and Lee, C. Y. (1992) Phenolic compounds in food In *phenolic compounds in food and their effects on health II*. Maple Press, New York, pp. 2-7.
- Park, S. W., Chung, Y. S., Yun, Y. S., Cha, B. S., Song, Y. D., Lee, H. C. and Huh, K. B. (1998) Insulin resistance and related factors in the healthy young men. *Diabetes* **22**, 504-512.
- Moon, S. J. and Hong, S. M. (1996) A study on the relation between psychological stress and stress hormone, nutritional status of patients with non-insulin dependent diabetes mellitus *Korean J. of Nutr.* **29**, 889-898.
- 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 Helicobacter pylori infection among normal Korean adults (in Korean). *J. Korean Soc. Mic.* **25**, 455-462.
- Rhee, K. H., Youn, H. S., Baik, S. C., Lee, W. K. Cho, M. J., Choi, H. J., Maenh, K. Y. and Ko, K. W. (1990) Prevalence of Helicobacter pylori infection in Korea (in Korean). *J. Korean Soc. Mic.* **25**, 475-490.
- Tabak, M., Armom, R., Potasman, I. and Neeman, I. (1996) In vitro inhibition of Helicobacter pylori by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 667-672.
- Diker, K. S. and Hascelik, G. (1994) The bactericidal activity of tea against Helicobacter pylori. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 299-300.
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M. S. (1995) In vitro inhibition of Helicobacter pylori NCTC 11637 by organic acids and lactic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 475-479.
- Bhatia, S. J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. and Mehta, A. P. (1989) *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2328-2338.
- Feng G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D. and Reek, G. R. (1996) Amylase inhibitors from wheat: Amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochem. Molec.* **26**, 419-426.
- Markwick, N. P., Laing, W. A., Cristeller, J. T., Reid, S. J. and Newton, M. R. (1996) α -amylase activities in larval midgut extracts from four species of Lepidoptera (Tortricidae and Gelechiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and streptomycin, *J. Econ. Entomol.* **89**, 39-45.

13. AOAC. (1989) Official method of analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. 43, 1-3.
14. Fuwa, H. (1954) A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. *J. Biochem.* **41**, 583-603.
15. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from berley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
16. Nonaka, G. H. (1989) Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure Appl. Chem.* **61**, 357-363.
17. Matsuo, T. and Ito, S. (1978) The chemical structure of kakin-tannin from immature fruit of the Persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1637-1643.
18. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature.* **26**, 1198-1199.
19. Moon, J. S., Kim, S. J., Park, Y. M., Hwang, I. S. and Kim, E. H. (2004) Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. *Korean J. Food Pre.* **11**, 207-213.
20. Paek, N. S. and Kim, Y. M. (1998) α -Glucosidase inhibition by culture broth of streptomyces sp. NS15. *Korean J. Food Nutr.* **11**, 640-646.
21. Mitsunaga, T., Abe, L., Kontani, M., Ono, H. and Tanaka, T. (1997) Inhibitory effects of bark proanthocyanidins on the activities of glucosyltransferases of *Streptococcus sobrinus*. L. Wood Shem. *Korean J. Food Nutr.* **17**, 327-340.
22. Lee, W. Y., Ahn, J. K., Park, Y. K. and Rhee, H. I. (2004) Inhibitory effects of proanthocyanidin extracted from *Distylium racemosum* of α -amylase and α -glucosidase activities. *Korean J. Pharmacogn.* **35**, 271-275.
23. Hulme, A. C. and J. D. Jones (1952) The isolation of chlorogenic acid from the apple fruit. *Biochem. J.* **53**, 337-340.
24. Cho, Y. J., An, B. J. and Choi, C. (1993) Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean green tea. *Korean Bio. J.* **26**, 216-223.
25. Jin, U. H., Lee, J. Y., Kang, S. K., Kim, J. K., Park, W. H., Kim, J. G., Moon, S. K., and Kim, C. H. (2005) A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sic.* **77**, 2760-2769.