

Antioxidant, angiotensin converting enzyme and xanthin oxidase inhibitory activity of extracts from *Saururus chinensis* leaves by ultrafine grinding

Young-Je Cho*

School of Food science and Biotechnology, Food and Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University,
Daegu 702-701, Korea

초미세 분쇄한 삼백초(*Saururus chinensis*) 추출물의 항산화, angiotensin converting enzyme 및 xanthin oxidase 억제 활성

조영제*

경북대학교 식품공학부, 식품생물산업연구소

Abstract

In this study, the biological activity of water and ethanol extracts from *Saururus chinensis* by ultra-fine grinding for functional food source are examined. It is more effective to use ethanol than water when extracting phenolic compounds. Approximately 2.5 times higher extraction yield were shown when it was ultra-fine grinded because the particle size decreases, thereby increasing the extraction yield. Normal grinded sample extracts showed 69.8% of DPPH inhibition effect, while fine grinded and ultra-fine grinded sample extracts showed 70.7% and 83.8% each, respectively. Normal extract, as well as fine grinded and ultra-fine grinded extracts, showed over 97% of ABTS inhibition effect, thereby indicating only a slight difference in the anti-oxidative activity with the grinding method. Higher PF was determined with fine grinded and ultra-fine grinded extracts than the normal grinded extract, while ultra-fine grinded 50% ethanol extracts showed the highest anti-oxidative activity value of 1.8 PF. The fine grinded and ultra-fine grinded particle sizes are smaller than the normal grinded particle size, thus increasing the inhibition rate of the TBARS. Furthermore, the ethanol extract was revealed to have a higher effect than the water extracts. The xanthin oxidase inhibition, on the other hand, was identified as ultra-fine grinded that led to the increase in the enzyme inhibition effect. In the angiotensin-converting enzyme, water extracts with normal grinding did not show inhibition activity, while 50% ethanol extracts showed 24% inhibition activity. Moreover, the ethanol extracts showed higher inhibition effect compared to the water extracts. Ultra-fine grinded 50% ethanol extracts showed a slight antibacterial effect on the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, while the other extracts showed none. The result suggests that *Saururus chinensis* extracts by ultra-fine grinding may be more useful than normal grinding as potential sources due to anti-oxidation, angiotensin converting enzyme and xanthine oxidase inhibition.

Key words : phenolic compounds, *Saururus chinensis*, antioxidant activity, angiotensin converting enzyme, xanthin oxidase

서 론

삼백초(*Saururus chinensis* Bail.)는 우리나라와 중국 및

일본 등 동북아시아에 주로 분포하며, 우리나라의 남부지방에서는 인공 재배되고 있는 식물이다. 삼백초는 삼백초과(*Saurceraceae*)에 속하는 여러해살이풀로 건조한 것이 약용으로 사용되며(1,2), 어성초(*Houttuynia cordata*)와 혼동하여 사용되는 경우가 종종 있으나 완전히 다른 식물로 분류된다. 삼백초가 가지는 약리적 효능은 해열, 해독, 소염,

*Corresponding author. E-mail : yjcho@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7755, Fax : 82-53-950-7762

소중 등의 작용이 있어 한방에서 수중, 각기 간염, 황달 및 암 등의 치료제로 이용되어 왔다(2). 삼백초에 함유된 주요 성분으로 hyperin, rutin, quercetin 및 quercetrin 등의 플라보노이드가 있다(3-5). 식물계에 다량 존재하는 flavonoid는 천연 항산화제로 주로 사용되며, 이러한 flavonoid는 지방질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과를 나타내어 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다. 또한 최근 각종 천연물로부터 항산화성 생리활성 물질은 검색하고 분리하고, flavonoid 화합물이 주요 화합물임을 구명한 연구들이 많이 보고되어 있다(6-9).

기능성 식품에 대한 관심이 증가하면서 기능성 물질(functional ingredient)의 효율적인 추출 및 이용에 대한 기술들이 주목 받고 있다. 천연 추출물을 포함한 기능성 물질들은 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부요인으로부터 영향을 받아 손상되기 쉬우며, 가공 및 유통 과정 동안 안정성이 저하되어 활성이 감소하게 된다. 또한 기능성 물질의 직접 섭취 시 낮은 투과성 등 다양한 영향에 의하여 stability가 감소하게 되면 그 결과 이들이 나타내는 생리활성의 활용에 막대한 영향을 받게 된다(10).

초미세분쇄 및 나노 technology는 첨단 기술로 식품 분야의 다양한 기술에도 응용할 수 있어 기존의 식품산업의 문제들을 해결할 수 있는 차세대 핵심기술로 각광 받고 있다(11). 초미세분쇄는 입자크기가 작아짐에 따라서 specific surface area의 증가효과와 capillary effect가 나타나게 된다. 표면적 증가효과는 표면현상과 연관성이 촉매반응에 큰 영향을 미쳐 생리활성 발현의 변화로 나타나게 된다. 또한, 모세관효과는 근본적인 물성을 변화시킴으로써 이전에 볼 수 없었던 새로운 현상들이 나타난다고 한다(12,13).

따라서, 본 연구에서는 초미세 분쇄가 삼백초잎으로부터 생리활성물질의 용출에 미치는 영향과 이들 추출물이 나타내는 다양한 생리활성의 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

미세분쇄와 초미세분쇄 삼백초 시료의 제조

본 실험에서 사용된 시료는 건조 시킨 삼백초잎을 mixer를 사용하여 분쇄하여 40 mesh를 통과한 분말을 일반분쇄 시료로 하였다. 초미세분쇄 시료는 삼백초잎을 한국생명공학연구원 정읍 분원에 있는 10 L 용량의 초미세 분쇄 장치(MKFS10-1, Koen 21 Co., Ansan, Korea)를 이용하여 시간당 20 kg의 grinding 속도로 fine grinding(125 µm ISO mesh size, ASTM 140 mesh : 미통과 사이즈)와 ultrafine grinding(125 µm ISO mesh size, ASTM 140 mesh : 통과

사이즈)으로 나누어 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

시료 1 g에 증류수 200 mL을 넣고 액이 100 mL이 될 때까지 가열한 후 냉각하고 ethanol 추출물은 시료에 100 mL의 60% ethanol을 가하고 homogenizer로 20,000 rpm에서 1분간 균질화 시킨 후 24시간 동안 교반 추출하였으며, 추출액은 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator(Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

Phenol성 화합물의 정량

Phenol성 화합물의 정량은 Kim 등의 방법(14)으로 측정하였으며, 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, 5% Na₂CO₃ 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

Electron donation ability 측정

DPPH(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(15)에 준하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60 µM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음의 식으로 나타내었다.

$$\text{Electron donation ability (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}\right) \times 100$$

ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법(16)으로 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 mL과 140 mM K₂S₂O₈ 88 µL를 섞어 어두운 곳에 16시간정도 방치한 용액 1 mL과 ethanol 88 mL를 혼합한 ABTS solution 1 mL과 시료용액 50 µL를 혼합하여 30초간 진탕한 후 2분 30초간 incubation하고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 percentage inhibition(%)으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}\right) \times 100$$

Antioxidant protection factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(17)으로 측정하였다. 10 mg의 β-carotene/50 mL chloroform 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을

증발시킨 후, 20 μ L linoleic acid, 184 μ L Tween 40과 50 mL H₂O₂를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion을 시료용액 100 μ L에 혼합하여 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였고 PF는 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Antioxidant protection factor} = \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}$$

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

TBARS는 Burge와 Aust의 방법(18)에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA/TCA 시약 2 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1000 rpm으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상정액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP)의 μ g으로 표시하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{1,1,3,3-tetraethoxypropane (\mu g) of control}}{\text{1,1,3,3-tetraethoxypropane (\mu g) of sample}}\right) \times 100$$

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해 효과 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법(19)으로 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질인 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL, Sigma, USA) 2.5 mM을 녹인 액 0.15 mL, ACE(0.25 unit/mL, Sigma, USA) 0.1 mL와 각 추출시료 용액 0.1 mL를 혼합하였으며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, 1 N HCl 0.25 mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 mL의 ethylacetate를 첨가하였다. Ethylacetate 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 2 mL의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 spectrophotometer를 사용하여 흡광도 280 nm에서 측정된 후 다음 식에 따라 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Content of hippuric acid in sample}}{\text{Content of hippuric acid in control}}\right) \times 100$$

Xanthin oxidase(XOase) 저해 효과 측정

Xanthin oxidase(XOase) 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte의 방법(20)에 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 추출용액 0.3 mL를 넣고 대조구에는 추출용액 대신 증류수를 0.3 mL 첨가하여

37°C에서 30분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Content of uric acid in sample}}{\text{Content of uric acid in control}}\right) \times 100$$

항균활성 검색

식중독의 원인균인 *Staphylococcus aureus* 표준균주인 KCTC 1039와 병원성 대장균인 *Escherichia coli*로서 표준균주인 KCTC 1039, 충치원인균인 *Streptococcus mutans*로서 표준균주인 KCTC 7965 및 위, 십이지장궤양 원인균인 *Helicobacter pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였고, *St. mutans* 및 *H. pylori* 배양은 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO₂ incubator를 이용하였고, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였으며, agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다(21).

항균력 측정은 paper disc법을 이용하여 측정하였다. 즉, 평판배지에 배양된 각 균주를 1 백금이 취해서 액체배지 10 mL에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체배지 10 mL에 균액을 0.1 mL 접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균수가 약 1×10^7 cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. Disc diffusion method에 의한 항균활성 검색은 최적배지 agar plate에 준비한 균 배양액 100 μ L를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 지름 8 mm 크기의 disc paper를 올려놓고 0.45 μ m membrane filter로 제균한 시료용액 100 μ L에 phenolics 농도가 50 μ g/100 μ L, 100 μ g/100 μ L, 150 μ g/100 μ L 및 200 μ g/100 μ L가 되도록 각각 분주하였다. 대조구로는 멸균수 100 μ L를 흡수시켜 24시간 동안 배양하여, disc 주위의 clear zone 생성 유무와 직경을 측정함으로써 항균활성을 계산하였다(22).

통계처리

실험 결과는 3번 이상 반복하여 측정된 후 평균값으로 나타내었으며, 실험결과와 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 평균값간의 유의성 검정(p<0.05)을 하였다.

결과 및 고찰

초미세분쇄가 phenolic 물질의 용출에 미치는 영향

식물계에 널리 분포되어 있으며, 삼백초잎에도 많은 양

이 함유되어 있다고 알려진 phenolic compounds는 식물 2차 대사산물의 한 종류로 분자구조에 hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합함으로써 여러 생리 기능을 가진다고 보고되어 있다(23).

초미세 분쇄 기술은 해당 물질의 표면적을 극대화시킴으로 분해가 어려운 물질들의 용해도를 높이는 장점이 있다. 또한 상대적으로 유용성 물질인 phenolic 화합물의 추출 수율을 높이고 추출 또한 용이하게 된다. 이러한 초미세 분쇄 기술은 1차 가공처리 기술을 넘어서 한약재 추출물의 용해도를 증진시켜 체내 흡수율 증가시킴으로 기능성 식품 소재나 식의약 소재 등 고부가 가치소재로 전환을 기대할 수 있다(24,25). 따라서 삼백초잎으로 부터 생리활성에 관여하는 phenolic compounds를 추출하기 위하여 일반분쇄, 미세분쇄 및 초미세분쇄 추출 등 추출방법을 달리하여 phenolic compounds의 용출량을 알아보았다. 그 결과 Table 1에서와 같이 물보다 ethanol을 이용하는 것이 효과적이며, 초미세 분쇄를 하였을 때 추출 수율이 증가하여 입자 크기에 대한 추출수율이 입자가 작아질수록 추출수율이 높아져 약 2.5배 높은 추출수율을 나타내었다. 유기용매로 추출하는 것이 물을 용매로 하여 추출하였을 때 보다 높은 추출율을 나타내어 삼백초 잎의 phenolic compounds가 극성용매에서 용해도가 높은 것으로 확인되어 유기용매에서 phenolic compounds의 추출수율이 높다는 Shin의 결과(26)와 유사하였다.

Table 1. Content of phenolic compounds in extracts from *Saururus chinensis* by grinding technique

Grinding technique	Phenolic content (mg/g)	
	Water extracts	50% Ethanol extracts
Normal grinding	6.2±1.2 ^a	6.4±1.6 ^a
Fine grinding	11.0±1.6 ^b	13.8±1.1 ^b
Ultrafine grinding	12.9±0.7 ^b	15.7±2.0 ^c

¹⁾Means separation within columns by 5% DMRT.

초미세 분쇄에 의해 제조된 시료 추출물의 항산화 활성 변화

전자공여능 측정에 사용되는 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH)는 고유의 흡수 스펙트럼을 나타내지만, phenolic compounds와 같이 전자공여체와 반응하게 되면 전자 hydrogen radical을 받아 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 없어지게 된다(27).

삼백초 잎 추출물을 이용하여 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법을 달리하여 추출한 추출물들에 대하여 전자공여능을 측정한 결과 Table 2에서와 같이 일반분쇄한 시료추출물에서 69.8%의 전자공여능 억제효과가 관찰되었고, 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서는 각각 70.7과 83.8%의 억제효과를 나타내어 입자크기가 작아질수록 추출수율이 높아진다는 앞에서의 결과에 따라 분쇄 방법에 따른 추출수율의 증가에 기인하여 전자공여능 억제효과가 높아진 것으로 판단하였다. Cho 등(28)이 진달래 추출물의 항산화 측정 결과, 열수 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 83.2, 89.7%의 전자공여능 억제효과를 나타낸다고 보고한 것과 비교하면 삼백초의 초미세분쇄 추출물과 유사한 효과를 나타낼 수 있었다. 추출물들의 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있으며, 표준물질의 사용으로 추출물의 상대 비교가 가능하도록 ABTS⁺ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 radical 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출물의 항산화효과를 측정하였다(16). 그 결과 Table 2에서와 같이 일반추출물과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출물 모두 97% 이상의 높은 항산화효과를 나타내어 분쇄 방법에 따른 차이는 거의 없었다. 이러한 결과로 보아 삼백초 물과 ethanol 추출물은 친수성 및 lipophilic 물질에 대한 항산화력이 우수한 것을 알 수 있었다. 지용성 물질에 대한 antioxidant protection factor 측정을 위하여 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법에 따른 antioxidant protection factor를 측정한 결과 Table 2에서와 같이 일반분쇄한 시료 추출물 보다 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서 더 높은 PF값을 확인하였으며 50% ethanol 초미세분쇄 추출물에서 1.8 PF로 높은 항산화력을 나타내어, 삼백초 추출물의 지용성물질에 대한 항산화력도 비교적 우수하다고 판단되었다. 지질과산화물인 malondialdehyde의 함량은 Burge와 Aust의 방법(18)을 이용하여 측정하였다. 일반추

Table 2. Antioxidant activity of *Saururus chinensis* extracts by grinding technique

Grinding technique	Antioxidant activity (%)							
	Water extracts				50% Ethanol extracts			
	DPPH (%)	ABTS (%)	PF	TBARS (%)	DPPH (%)	ABTS (%)	PF	TBARS (%)
Normal grinding	69.8±1.2 ^a	97.7±2.1 ^a	0.9±0.1 ^a	74.5±1.7 ^a	49.3±1.1 ^a	96.8±2.6 ^a	1.0±0.1 ^a	79.2±2.4 ^a
Fine grinding	70.7±1.5 ^a	98.5±1.8 ^{ab}	1.1±0.2 ^a	81.2±3.1 ^a	53.4±1.7 ^a	96.7±2.1 ^a	1.0±0.1 ^a	86.7±1.6 ^{ab}
Ultrafine grinding	83.8±1.8 ^b	99.4±0.8 ^b	1.5±0.1 ^b	88.7±1.4 ^b	89.8±1.4 ^b	98.7±1.3 ^a	1.8±0.1 ^b	91.3±2.2 ^b

¹⁾Means separation within columns by 5% DMRT.

출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법을 달리 하여 제조한 추출물의 thiobarbituric acid reactive substance를 측정된 결과 Table 2에서와 같이 일반분쇄한 시료 추출물에서 74.5%(water extracts)와 79.2%(ethanol extracts)의 TBARS 억제효과가 관찰되었고, 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서는 각각 81.2%, 88.7%와 86.7%, 91.3%의 억제효과를 나타내어 입자크기가 작아질수록 추출수율이 높아지며, 물추출물보다 ethanol 추출물의 효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.

초미세 분쇄에 의해 제조된 시료의 xanthine oxidase 저해 활성 측정

Xanthine oxidase는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 urate가 관절에 축적되어 심한 통증을 동반하는 관절염인 통풍을 유발하는 효소이다(29). Xanthin oxidase는 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매하는 작용을 하므로 xanthin oxidase의 저해 효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법을 달리하여 추출한 삼백초 잎 추출물들에 대하여 xanthin oxidase 저해 활성을 측정된 결과 Table 3에서와 같이 물 추출물의 경우 삼백초는 7% 정도로 미세분쇄하지 않은 시료와 크게 차이나지 않았다. Ethanol 추출물의 경우 분쇄하기 전에 30.7%의 억제율을 나타내는 것에 비하여 초미세분쇄 후 42.6%의 효소 억제 효과를 나타내어 초미세분쇄에 의한 활성 증대효과를 기대할 수 있었다. 이는 입자크기가 작아질수록 추출수율

Table 3. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Saururus chinensis* extracts by grinding technique

Grinding technique	Inhibition rate of xanthine oxidase (%)	
	Water extracts	50% Ethanol extracts
Normal grinding	6.6±0.2 ^{ab}	30.7±0.3 ^a
Fine grinding	6.5±0.5 ^a	33.2±0.1 ^b
Ultrafine grinding	7.3±0.2 ^b	42.6±0.2 ^c

¹⁾Means separation within columns by 5% DMRT.

Table 4. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Saururus chinensis* extracts by grinding technique

Grinding technique	Inhibition rate of angiotensin converting enzyme (%)	
	Water extracts	50% Ethanol extracts
Normal grinding	-	24.21±1.2 ^a
Fine grinding	15.23±0.8 ^a	24.61±0.6 ^a
Ultrafine grinding	32.75±1.2 ^b	47.94±0.9 ^b

¹⁾Means separation within columns by 5% DMRT.

이 높아진다는 앞에서의 결과에 따라 분쇄방법에 따른 추출수율의 증가에 기인하여 xanthin oxidase의 억제역할을 수행하는 물질의 용출이 높아진 때문인 것으로 판단하였다.

초미세 분쇄방법에 의해 제조된 시료의 angiotensin converting enzyme 저해 활성 측정

고혈압은 뇌혈관 질환, 심혈관 질환 등을 일으키는 대표적인 원인으로 식생활의 서구화됨에 따라 급속도로 증가하였다. 고혈압은 우리나라에서 암 다음으로 많이 발생하는 대표적 성인 질환으로 그 원인은 renin-angiotensin계가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 여겨지고 있으며, 여기에는 angiotensin converting enzyme(ACE)이라는 효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 생체 중에 존재하는 불활성형의 angiotensin I은 ACE에 의해 dipeptide가 떨어져 나감으로써 혈관벽 수축작용이 있는 angiotensin II로 전환된다. 이 물질은 강력한 혈관수축작용을 가지고 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며, 또한 혈관이완작용을 갖는 bradykinin을 불활성화 시켜 혈압을 상승시키는 역할을 한다(30). 식물이 2차대사산물로 생산하는 phenolic compound들은 종류에 따라서 이 효소의 작용을 저해함으로써 고혈압의 치료가 가능하다고 알려져 있다(31,32). 본 연구에서는 삼백초 잎 추출물의 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법을 달리하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 일반추출의 경우 물추출물에서는 활성이 나타나지 않았고 50% ethanol 추출물에서 24%의 억제율이 확인되었고, ethanol 추출물의 억제효과가 물추출물에 비해 상대적으로 우수한 억제 효과를 나타내었다. 또한 미세 분쇄보다 초미세 분쇄 추출물이 우수한 고혈압 억제효과를 나타내어 초미세 분쇄를 통한 ethanol 추출이 생리활성의 활용 측면에서 매우 유리할 것이라 판단되었다. 일반적으로 phenol 유래 화합물의 페놀성 수산기에 의해 단백질과 복합체의 침전물을 형성하여 비경쟁적으로 효소를 저해함으로써 효소 불활성화를 일으키는 것으로 보고되었다(31). 이러한 phenol성 화합물들은 ACE 저해작용에 의해 고 renin증 환자에서 뿐만 아니라 정상인에서도 현저한 혈압강하 작용을 가지며, 고혈압 치료제로서 응용이 가능하다고 보고되었다(31-33).

삼백초 추출물의 항균활성

삼백초 잎의 일반추출과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출 등 추출방법을 달리하여 추출물의 항균활성을 측정하기 위하여 식중독균인 *S. aureus*, *E. coli*와 충치균인 *St. mutans*, 위염균인 *H. pylori*를 사용하여, agar plate상에서 37℃의 incubator로 24~48시간 동안 배양한 결과 일반추출과 미세분쇄 추출물에서는 항균활성이 전혀 검출되지 않았고, 초미세분쇄 추출물에서는 Table 5에서와 같이 50% ethanol 추출물에서 *S. aureus*, *E. coli*에 대해서 아주 약한 항균효과를 나타내었을 뿐 항균효과는 거의 관찰되지 않았다.

Table 5. Antimicrobial activity of ultrafine grinding *Saururus chinensis* extracts

Strains	Clear zone (cm)									
	Content of phenol compounds ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)									
	Water extracts					50% Ethanol extracts				
	Control	50	100	150	200	Control	50	100	150	200
<i>S. aureus</i>	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	trace
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	trace
<i>S. mutans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. pylori</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾ND : not detected

요 약

초미세 분쇄를 하였을 때 입자가 작아질수록 추출수율이 높아져 약 2.5배 높은 추출수율을 나타내었다. 일반 분쇄한 시료 추출물에서 69.8%의 전자공여능 억제효과가 관찰되었고, 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서는 각각 70.7과 83.8%의 억제효과를 나타내었다. 일반분쇄 추출물과 미세분쇄 및 초미세분쇄 후 추출물 모두 97% 이상의 높은 ABTS 억제효과를 나타내어 분쇄 방법에 따른 항산화력의 차이는 거의 없었다. 일반 분쇄한 시료 추출물 보다 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서 더 높은 PF값을 확인하였으며, 50% ethanol 초미세분쇄 추출물에서 1.8 PF로 가장 높은 항산화력을 나타내었다. 미세분쇄와 초미세분쇄 추출물에서는 일반분쇄 추출물에 비해 입자크기가 작아질수록 TBARS 억제율이 높아지며, 물 추출물보다 ethanol 추출물의 효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. Xanthin oxidase 저해의 경우 초미세분쇄 후 효소억제 증대 효과를 확인할 수 있었다. Angiotensin converting enzyme 억제활성은 일반분쇄 추출의 경우 물 추출물에서는 억제활성이 나타나지 않았고, 50% ethanol 추출물에서 24%의 억제율이 확인되었다. 또한, ethanol 추출물의 억제효과가 물 추출물에 비해 상대적으로 우수하였다. 50% ethanol 초미세분쇄 추출물에서 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*에 대해서 아주 약한 항균효과를 나타내었을 뿐 나머지 추출물에서의 항균 효과는 거의 관찰되지 않았다.

감사의글

이 논문은 지식경제부에서 시행한 지역산업전략기획기술포발사업의 결과이며, 연구개발비 지원에 감사드립니다. 이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

References

1. Lee ST, Park JM, Lee HK, Kim MB, Cho JS, Heo JS (2000) Component comparison in different growth stages and organs of *Saururus chinensis* Bail. Korean J Med Crop Sci, 8, 312-318
2. Kim SK, Kim YH, Kang DK, Chung SH, Lee SP, Lee SC (1998) Essential oil content and composition of aromatic constituents on leaf of *Saururus chinensis*, *Angelica dahurica* and *Cnidium officinale*. Korea J Med Crop Sci, 6, 299-304
3. Choe KH, Yoon CH, Kwon SJ (1994) A study on chemical composition of *Saururaceae* growing in Korean on flavonoid constituents of *Saururus chinensis*. J Korean Soc analytic Sci, 7, 11-15
4. Lee ST, Lee YH, Choi YJ, Lee YH, Choi JS, Heo JS (2001) Yield and bioactive component on different compost amounts and culture method of *Saururus chinensis* Bail. Korean J Med Crop Sci, 9, 220-224
5. Kim BH, Song WS (2000) The dyeability and antimicrobial activity of *Saururus chinensis* (L). J Korean Home Econom, 38, 1-9
6. Lim DK, Choi U, Shin DH (1996) Antioxidant activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. Korean J Food Sci Technol, 28, 83-89
7. Park SS, Yu KH, Min TJ (1998) Antioxidant activity of ethanol extract from fruiting bodies of mushrooms. Korean J Mycology, 26, 69-77
8. Lee JM, Son ES, Oh SS, Han DS (2001) Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. Korean J Diet Cul, 16, 504-514
9. Kim NM, Ko SR, Choi KJ, Kim WJ (1993) Effect of some factors on extraction of effectual components in cinnamon extract. J Korean Agric Chem Soc, 36, 17-22

10. Bell LN (2001) Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In : Handbook of nutraceuticals and functional foods. Wildman REC(ed). CRC press, New York, p 501-516
11. Lopez-Rubino A, Gavara R, Lagaron JM (2006) Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. Trends Food Sci Technol, 17, 567-575
12. Kim KH, Lee IH, Lee HS, Park JK (2003) R&D trend and information analysis of nanoparticles. Pros Ind Chem, 6, 46-61
13. Kim CS, Kim CS, Kim HI (2009) Physicochemical properties of non-waxy rice flour affected by grinding methods and steeping times. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 1076-1083
14. Kim JS, Lee JY, Park KT, An BJ, Lee SH, Cho YJ (2013) The biological activity from *Prunella vulgaris* extracts. Korean J Food Preserv, 20, 234-241
15. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200
16. Pellegrin N, Roberta R, Min Y, Catherine RE (1998) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis(3-ethylene benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Method Enzymol, 299, 379-389
17. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Ahrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). J Agric Food Chem, 47, 1776-1780
18. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Method Enzymol, 105, 302-310
19. Cushman DW, Cheung HS (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol, 20, 1637-1648
20. Stirpe F, Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthin oxidase. J Biol Chem, 244, 3855-3862
21. Gavidson PH, Parish ME (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. J Food Technol, 43, 148-154
22. Stevenson TH, Lucia LM, Acuff GR (2000) Development of selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. Appl Environ Microbiol, 66, 723-727
23. Choi HS, Kim MG, Shin JJ, Pack JM, Lee JS (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 723-727
24. Han MR, Chang MJ, Kim MH (2007) Investigation of physical property change in modified rice starch by ultra fine pulverization. J Korean Soc Appl Biol Chem, 50, 160-166
25. Han MR, Kim AJ, Chang MJ, Lee SJ, Kim HS, Kim MH (2009) Investigation of physical property change in modified corn starch by ultra fine pulverization. Food Bioeng Progress, 13, 335-340
26. Shin HL (2003) Biological activity of phenol compound from mulberry fruits. MS Thesis, Sangju National University, Korea.
27. Aoshima H, Tsumoue H, Koda H, Kiso Y (2004) Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. J Agric Food Chem, 52, 5240-5244
28. Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MU, Kwon OJ (2008) Screening of biological activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 276-281
29. Noro T, Fukushima S (1988) Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. Chem Pharm Bull, 31, 3984-3988
30. Miyoshi D, Richard LS (1975) Pulmonary angiotensin converting enzyme. J Biol Chem, 250, 6762-6768
31. Funayama S, Hikono H (1979) Hypotensive principles of *Diospyros kaki* Leaves. Chem Pharm Bull, 27, 2865-2871
32. Stewart JM, Ferreira SH, Greene LJ (1971) An inhibitors of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. Biochem Pharmacol, 20, 157-163
33. Kameda K, Takaku T, Okyada H, Kimyra S (1987) Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. J Natural products, 50, 680-686