

당조고추 70% 에탄올추출물의 항산화 및 항암활성측정

†이 연 리

대전보건대학교 식품영양과

Anti-Oxidative and Anti-Proliferative Effect of 70% Ethanol Extracts from Green Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo)

†Youn Ri Lee

Dept. of Food and Nutrition, Daejeon Health Institute of Technology, Daejeon 34504 Korea

Abstract

To evaluate the anti-oxidant and anti-tumor potential of the green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo), total polyphenol content, radical scavenging activities and anti-tumor properties were measured. The total polyphenol content of the 70% ethanol extracts from green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo) was 30.29 mg gallic acid equivalent/g extract. The DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activities of 70% ethanol extracts of green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo) were documented at 2.87 and 10.55, respectively. For α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity, 70% ethanol extracts of green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo) were documented at 35.67% and 58.41% respectively. The green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo) demonstrated greater capability in terms of anti-neoplastic activity vis-a-vis colon cancer cell lines when compared to other cancer cell lines. *Capsicum annuum* L. cv. DangZo higher activities of anticancer activities on colon cancer cell lines compared to other cancer cell lines.

Key words: green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo), antioxidant activity, α -glucosidase inhibitory activity, α -amylase inhibitory activity, antitumor activity

서 론

최근 현대인들은 불규칙한 식습관 때문에 영양불균형이 초래되어 여러 가지 대사질환을 겪고 있다. 이에 따라 질병과 밀접한 관계가 있는 식습관에 대한 관심이 증가하고, 비타민, 미네랄, 폴리페놀 등 식물에 포함되어 있는 다양한 물질이 질병의 예방과 치료에 효과가 있는 것의 연구가 널리 진행되어 왔다(Kang 등 2004; Jung 등 2008; Um 등 2010).

고추(*Capsicum annuum* L.)는 열대성 식물로 가지과(Solanaceae) 속하는 한해살이풀로, 우리나라에서는 늦봄부터 여름에 재배되며, 김치의 주재료로써 오래전부터 식재료로 사용됐다(Hasler CM. 1998; Howard LR 2010). 고추의 주요 성분인 capsanthin, capsaicin, vitamin, capsaicin, 그중에서도 5종

의 동족체 중 capsaicin과 dihydrocapsaicin이 매운맛의 주성분이 된다(Lee 등 1995; Son 등 2010). 특히 고추의 매운맛 성분인 capsaicin은 당뇨병성 신경성증이나 관절염, 대상포진 후 신경통, 피부건선 등의 치료 효과가 보고되어 있으며, 항암 활성에 대한 연구도 많이 진행되어 있다(Zhang & Po 1994; Mori 등 2006).

당조고추(*Capsicum annuum* L. cv. DangZo)는 당을 조절해주는 고추라는 뜻으로 우리 몸속에서 탄수화물 소화 흡수를 저하시키는 물질로 AGI(α -glucosidase inhibitor)라고 하는 성분이 일반 고추보다 당조고추에 최대 5배 정도 더 많이 함유되어 있어서 당뇨를 예방하고, 혈당이 높으신 분들이 혈당을 관리하는데 도움이 된다고 보고되고 있다(Zhu YX 2014).

따라서 본 연구는 당조고추를 70% 에탄올로 추출하여 항

† Corresponding author: Youn Ri Lee Dept. of Food and Nutrition, Daejeon Health Institute of Technology, Daejeon 34504, Korea. Tel: +82-42-670-9246, Fax: +82-42-670-9246, E-mail: leeyounri@hit.ac.kr

산화 활성 및 항암활성을 측정하여 기능성 소재로서의 이용 가능성을 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 당조고추를 충청지역에 농가에서 2016년 7월에 구입하여 사용하였다. 당조고추를 70% 에탄올로 추출한 후 No 2. filter paper(Advantec Co., Tokyo, Japan)로 여과하여 농축한 다음, 동결건조기(FD 5508, Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)로 동결건조하여 사용하였다.

2. 총 폴리페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Dewanto 등(2002)에 준하여 측정하였다. 시료액 150 μ L에 2,400 μ L의 증류수와 Folin-Ciocalteu reagent 150 μ L를 가한 후 3분간 방치하고, 1 N sodium carbonate (Na_2CO_3) 300 μ L를 가하여 암소에서 2시간 동안 반응시킨 후, 725 nm에서 흡광도(V-530, Jasco, Tokyo, Japan)를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 표준 검량선으로 부터 추출물의 총 페놀 함량을 계산하였다.

3. DPPH radical 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법에 의해 측정하였다. 각 추출물을 농도별로 제조한 시료에 DPPH 200 μ L를 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC_{50} 로 표시하였다.

4. Hydroxyl radical 소거능 측정

Hydroxyl radical 소거능은 Smirnov & Cumbes(1989)의 방법에 의해 측정하였다. 추출된 각 시료는 일정 농도로 희석한 후 시료 100 μ L에 100 mM sodium phosphate (pH 7.4) 250 μ L, 1 mM EDTA 100 μ L, 36 mM deoxyribose 100 μ L, 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 μ L, 1 mM L-ascorbic acid 100 μ L, 10 mM H_2O_2 100 μ L, 증류수 150 μ L를 가하여 38°C water bath에서 1시간 방치한 후, 1% thiobarbituric acid 1 mL, 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 끓인 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC_{50} 로 표시하였다.

5. α -Glucosidase 저해활성 측정

α -Glucosidase 저해활성은 Tibbot과 Skadsen(15)의 방법에 따라 측정하였다. α -Glucosidase (0.35 U/mL)와 p -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (1.5 mM, PNPG)는 0.1M sodium phosphate

buffer (pH 7.0)에 용해하여 사용하였으며, 각각의 추출물 50 μ L를 0.35 unit/mL α -glucosidase 효소액 100 μ L와 혼합하여 37°C에서 10분간 전배양한 후 1.5 mM PNPG 50 μ L를 가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 1M Na_2CO_3 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA (UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 저해율(%)을 계산하였으며, 양성대조군으로 acarbose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

6. α -Amylase 억제활성

α -Amylase 저해활성은 Xu 등(2011)의 방법을 변형하여 수행하였다. 추출물의 분획물에 타액 유래 α -amylase 효소액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 혼합하여 기질 용액인 1% starch를 넣어 교반한 후, 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 용액을 넣고 100°C에서 5분간 끓여 발색을 시켰다. 그 후 냉각하여 증류수를 넣고 교반한 뒤 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 대조군으로 acarbose를 사용하였다.

7. 항암활성측정

본 실험에서 사용한 암세포는 인체 대장암세포(HCT-116), 폐암세포(A-549), 위암세포(AGS) 및 간암세포(Hep-G2)을 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 U/mL penicillin G, 50 μ g/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640(Gibco Co., NY, USA)을 사용하여 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 실시하였다. 당조고추 70% 에탄올 추출물의 암세포주 증식에 미치는 영향은 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 실험하였다. 즉, 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고, 배지에 일정 농도로 희석된 추출물을 100 μ L를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well당 10 μ L씩 분주한 다음, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양한 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ L를 가한 다음 상온에서 발색시키고, ELISA microplatereader (ELx808, BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

실험 결과는 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표

준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 당조고추 70% 에탄올 추출물의 항산화 성분 및 라디칼 소거능 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석한 결과는 Table 1과 같다.

당조고추의 폴리페놀함량은 30.29 mg GAE/g extract로 나타났다. Lee 등(2008)의 연구에 의하면 고추잎의 열수추출물, 메탄올추출물, 70% 아세톤 추출물에서 각각 36.4, 40.3, 56.6 mg GAE/g으로 나타났다. Sung 등(2016)의 연구에서도 꽃고추, 홍고추, 꽃피망 에탄올 추출물에서 각각 34.12, 18.78, 26.57 mg GAE/g으로 나타났다. Kwon JE(2011) 연구에서 국내산 홍고추 메탄올 추출물의 6품종에 대한 폴리페놀함량을 비교한 결과는 5~7 mg/g으로 나타났으며, Chen 등(2012)의 연구에서도 홍고추 메탄올 추출물 5품종에서 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과 12.47~23.11 mg/g으로 나타나, 본 연구와 유사한 결과를 보인다.

식물류의 생리활성은 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물의 함유량에 의존적이므로, 대부분의 식물류는 이들 물질의 함량에 따라 항산화 활성이 증가하는 경향을 보인다(Jung 등 2004).

DPPH radical은 짙은 보라색을 띠는 자유 라디칼로 항산화 물질과 반응하면 자유 라디칼이 억제되어 안정한 형태로 돌아가면서 짙은 보라색이 옅어짐에 따라 흡광도를 통해 간접적으로 측정할 수 있다(Kang 등 2009).

당조고추 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, IC₅₀ 값이 3.01 mg/mL로 나타내었다. Cho 등(2001)의 연구에서 고추잎의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC₅₀ 값이 0.12로 보고하였다. Sung 등(2016)의 연구에서도 꽃고추, 홍고추, 꽃피망 에탄올 추출물(2 mg/mL)에서 DPPH 라디칼 소거능이

각각 43.13%, 34.34%, 31.04%로 나타났다

Hydroxyl 라디칼은 라디칼 중에서 가장 반응성이 높고, 인접한 생체 분자에 심각한 손상을 야기한다(Drews 등 2010).

Hydroxyl 라디칼에 대한 당조고추 70% 에탄올 추출물의 소거능을 살펴보면 IC₅₀ 값이 10.55 mg/mL로 나타났다.

Kang 등(2002)의 보고에 의하면 전자공여능이 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표이며, phenol성 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높은 것으로 나타났다.

2. 당조고추 70% 에탄올 추출물의 α-glucosidase 및 α-amylase 억제 활성 측정

α-Amylase는 탄수화물의 α-D-(1,4)-glucan 결합을 분해하는 효소이고, α-glucosidase 소장 상피세포의 Brush-Border membrane에 존재하는 효소로서 소장에서 음식물 중의 전분을 포도당과 같은 단당으로 분해하여 흡수시킨다(Lee 등 2008; Kim 등 2011). 따라서 소장의 α-amylase와 α-glucosidase를 저해함으로써 포도당의 흡수를 지연시킬 수 있어 혈당수치 상승억제의 지표로써 사용된다(Lee 등 2008; Oh 등 2008).

당조고추 70% 에탄올 추출물 10 mg/mL의 농도에서 α-glucosidase 및 α-amylase 저해활성은 각각 35.67, 58.41%로 나타났다. Zhu YX(2014) 연구에서 α-glucosidase의 당조고추잎에서 분리한 luteolin-7-o-apiofuranosyl(1 → 2)glucopyranoside와 apogenin-7-o-apiofuranosyl(1 → 2)glucopyranoside에서 α-glucosidase 억제효과가 나타났다고 보고하고 있다.

따라서 당조고추 70% 에탄올 추출물은 탄수화물 소화과정에서 α-glucosidase 및 α-amylase에 의한 단당류의 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이 상승하는 증상에 효과적인 것으로 보인다.

3. 당조고추 70% 에탄올 추출물의 항암활성 측정

당조고추 70% 에탄올 추출물의 인체 대장암세포(HCT-116), 폐암세포(A549), 위암세포(AGS) 및 간암세포(Hep-G2) 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과가 Fig. 1과 같다. 특히 대

Table 1. Total polyphenol contents, DPPH and hydroxyl radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo)

Sample	Total polyphenol (mg GAE ² /extract g)	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL ³)	Hydroxyl radical scavenging activity (IC ₅₀ mg/mL)
Ascorbic acid	-	0.21±0.01 ¹⁾	3.01±0.05
Green pepper (<i>Capsicum annuum</i> L. cv. DangZo)	30.29±0.20 ¹⁾	2.87±0.01	10.55±0.17

¹⁾ Values represent means±S.D. of triplicate determinations.

²⁾ GAE, gallic acid equivalents.

³⁾ Concentration required for 50% reduction of radical scavenging activity.

Table 2. α -Glucosidase and α -amylase inhibition activity of 70% ethanol extracts from green pepper (*Capsicum annuum* L. cv. DangZo)

Sample	α -Glucosidase inhibition activity(%)	α -Amylase inhibition activity(%)
Acarbose (5 mg/mL)	83.14 \pm 0.01	82.77 \pm 0.02
Green pepper (10 mg/mL) (<i>Capsicum annuum</i> L. cv. DangZo)	35.67 \pm 0.21	58.41 \pm 1.06

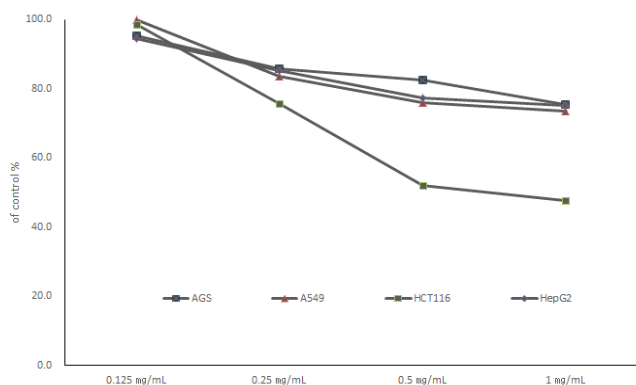


Fig. 1. Anticancer activity on 70% ethanol extraction of *Humulus japonicus* cell were treated with different concentrations of 0.125, 0.250, 0.5 and 1 mg/mL after 24 hr incubation viable cells were analyzed using MTT assay. The values represent mean \pm S.D. of triplicate independent experiments.

장암 세포주에서 0.5 mg/mL에서 50% 암세포 성장억제율이 높게 나타났다.

Lee 등(2008)의 연구에 의하면 고추잎 추출물에 대한 대장 암세포에서는 70% 아세톤 추출물이 1 mg/mL의 농도에서 96.2%의 증식억제 활성을 나타내었고, 유방암세포에서는 메탄올 추출물이 78.4%의 활성을 나타내었으며, 위암세포에서는 열수추출물에서 89.7%억제활성을 나타내었다.

요 약

당조고추의 기능성 소재로서의 가능성을 알아보기 위하여 당조고추 70% 에탄올 추출물에 대한 항산화 활성 및 항암활성을 측정하였다. 당조고추 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀은 30.29 mg GAE/g extract로 나타났다. 당조고추 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH radical 및 hydroxyl radical 소거활성을 IC₅₀% 측정한 각각 2.87, 10.55 mg/mL의 소거활성을 보여주었으며, α -glucosidase 및 α -amylase 저해활성은 10 mg/mL의 농도에서 각각 35.67, 58.41%로 나타났다. 당조고추 70% 에탄올 추출물에 대한 항암활성은 대장암 세포주의 0.5 mg/mL 농도에서 50% 암세포 성장억제를 보였지만, 다른 암세포에

서는 억제효과를 나타내지 않았다.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1203
- Byun EB, Park WY, Ahn DH, Yoo YC, Park CH, Jang BS, Park WJ, Byun EH, Sung NY. Comparison study of three varieties of red peppers in term of total polyphenol, total flavonoid contents and antioxidant activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45:765-770
- Chen L, Hwang JE, Gu KM, Kim JH, Choi BR, Song KS, Park YM, Kang YH. 2012. Comparative study of antioxidant effects of five Korean varieties red pepper (*Capsicum annuum* L.) extracts from various parts including placenta, stalk, and pericarp. *Food Sci Biotechnol* 21:715-721
- Cho SY, Han YB, Shim KH. 2001 Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 133-137
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964
- Drews G, Krippeit-Drews P, Dfer M. 2010. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Archiv* 460:703-718
- Hasler CM. 1998. Functional foods: Their role in disease prevention and health. *Food Technol* 52:63-69
- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B, 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem* 48:1713-1720
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, OhkuraY, Ueno KA. 1996. Combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium-salt, neutral red and ceystal violet. *Biol Pharm Bull* 19:1518-1520
- Jung EB, Jo JH, Cho SM. 2008. Nutritional component and anti-cancer properties of various extracts from Haesongi mush-

- room (*Hypsizigus marmoreus*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:1395-1400
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47:135-140
- Kang MH, Cho CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean J Food Sci Technol* 34:1098-1102
- Kang MY, Kim SY, Yun HJ, Nam SH. 2004. Antioxidative activity of the extracts from browned oak mushroom (*Lentinus edodes*) with unmarketable quality. *Korean J Food Sci Technol* 36:648-654
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Mood KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. 1995. *Korean J Food Sci Technol* 27:978-984
- Kwon JE. 2011. Determination of biological activity on methanol extracts of *Capsicum annuum* L. from different varieties. MS Thesis, Kyungpook National Univ. Daegu. Korea
- Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM. 2011. Screening α -amylase α -glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon-do wild plants extracts. 40:308-315
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han D, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:405-409
- Lee Y, Howard LR, Villalon B. 1995. Flavonoids and anti-oxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci* 60:473-476
- Mori A, Lehmann S, O' Kelly J, Kumagai T, Desmond JC. 2006. Capsaicin, a component of red pepper, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res* 66:3222-3229
- Oh SJ, Hong SS, Kim YH, Koh SC. 2008. Screening of biological activities in fern plants native to Jeju island. *Korean J Plant Res* 21:12-18
- Song W, Derito CM, Liu MK, He X, Dong M, Liu RH. 2010. Cellular antioxidant activity of common vegetables. *J Agric Food Chem* 58:6621-6629
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060
- Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30:229-241
- Um SN, Jin GE, Park KW, Yu YB, Park KM. 2010. Physiological activity and nutritional composition of *Pleurotus* species. *Korean J Food Sci Technol* 42:90-96
- Xu ML, Wang L, Xu GF, Wang MH. 2011. Antidiabetic and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L) Hill extract. *Kor J Pharmacogn* 42:61-67
- Zhang WY, Po ALW 1994 The effectiveness of topically applied capsaicin. *Eur J Clin Pharmacol* 46:517-522
- Zhu YX. 2014. Study on antidiabetic effects of leaves of Dangzuo in mice. Ph. D. Thesis, Wonkwang Univ. Iksan. Korea

Received 24 July, 2017

Revised 19 September, 2017

Accepted 28 September, 2017