

Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Smilax China* L.

Soo-Yeon Lee¹, Jeung-Hoan Kim¹, Jung-Mi Park¹, In-Chul Lee², Jin-Young Lee^{1*}

¹Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Department of Cosmetic Science and Technology, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

청미래덩굴(*Smilax China* L.) 추출물의 항산화 및 α -amylase와 α -glucosidase 저해활성

이수연¹ · 김정환¹ · 박정미¹ · 이인철² · 이진영^{1*}

¹호서대학교 한방화장품과학과, ²서원대학교 화장품과학과

Abstract

This study was carried out to analyze the effects of water and 70% ethanol extract on the antioxidative and antidiabetic activities of *Smilax china* L., a vine shrub belonging to the lily family. The activities of the extracts were measured based on the total phenolic and flavonoid contents and through on the results of the antioxidant tests, such as the electron-donating ability, ABTs radical scavenging activities, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition effect, antioxidant protection factor (PF), TBARS content and ACE inhibition activity, and α -glucosidase, and α -amylase inhibition activity. The resulting total phenolic and flavonoid contents of the 70% ethanol extract from *S. china* L. were greater than those of the water extract from *S. china* L. With regard to the results of the antioxidant tests, such as the electron-donating ability, ABTs radical scavenging activity, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition effect, antioxidant protection factor (PF), and TBARS content, those from the 70% ethanol extract from *S. china* L. were greater than those from the water extract from *S. china* L. Also, with regard to the ACE inhibition effect and α -glucosidase and α -amylase inhibition, those from the 70% ethanol extract from *S. china* L. were greater than those from the water extract from *S. china* L. All these findings show that the 70% ethanol extract from *S. china* L. has greater antioxidative and antidiabetic effects and can be used as a preventive agent for oxidation and diabetes.

Key words : antidiabete, antioxidant, *Smilax china* L., phenolic and flavonoid

서 론

인간이 살아가는데 필요한 에너지는 체내에서 끊임없이 일어나는 생화학적 산화반응을 통해 충족된다. 이때 여러 장기 및 조직에서 세포내로 산소를 받아들이면 미토콘드리아 내에서 산소 대사과정이 일어나는데 이 과정에서 발생하는 활성산소는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소(³O₂)가 산화·환원과정에서 생성되는 superoxide(¹O₂⁻)와 hydroxy radical([·]OH)과 같은 짝 짓지 않은 상태의 free radical 및

과산화수소(H₂O₂)를 통칭한다(1,2). 이런 활성 산소종은 멜라닌 생성을 촉진시키며 활성산소종과 그 유도체는 생체 내에서 많은 분자, 단백질, DNA 등을 공격하여 세포의 노화, 변형 등 활성산소에 의해 생성되는 여러 가지 질병들 중 당뇨병의 유병율이 빠른 속도로 증가할 뿐만 아니라 유병 연령이 점차 낮아지고 있어 그 심각성이 대두되고 있다(3). 당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 일련의 대사 질환군으로 삶의 질을 떨어뜨리는 1위 질환으로서 전세계 인구의 3%가 당뇨병으로 고통 받고 있으며, 국내에서도 당뇨병 및 대혈관 합병증, 미세혈관합병증, 당뇨병성 신경병증 및 신장질환 등과 같은 당뇨병 합병증으로 인한 사망률이 전체 사인의 네 번째를 차지하는 것으로 보고되고

*Corresponding author. E-mail : jyilee@hoseo.edu
Phone : 82-41-540-9552, Fax : 82-41-540-9538

있다(4,6). 당뇨병은 인슐린 의존형인 제 1형과 인슐린 비의존형인 제 2형 당뇨병으로 분류되고 우리나라의 경우 제 2형의 당뇨병 환자가 대부분을 차지하고 있다(7). 이러한 당뇨병의 치료 및 합병증을 예방하기 위해서는 약물치료, 식이요법, 운동요법에 의존하여 지속적으로 혈당을 유지할 수 있도록 관리하는 것이 중요하다. 하지만 현재 약물 복용에 따른 독성문제와 환자의 내성문제 등 많은 부작용이 대두되고 있으며 시판되고 있는 acarbose나 voglibose 등의 α -glucosidase 저해제가 시판되고 있으나, 이들 약제를 장기간 복용할 경우 일부 환자에게서 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용이 나타날 수 있어 사용이 제한될 수 있다(8,9). 이러한 부작용을 줄이고 혈당을 낮추는 효과를 가지는 약용식물들에 대한 관심이 높아지면서 새로운 α -glucosidase나 α -amylase 저해물질을 찾는 연구가 꾸준히 진행되고 있으며, 특히 당뇨병과 항산화 작용이 밀접한 관계가 있는 것으로 알려지면서 약용 식물 추출물에 대한 항산화 및 항당뇨 연구가 활발히 수행되고 있다(10-12).

청미래덩굴(*Smilax China* L.)는 한국, 일본, 중국, 필리핀 및 인도차이나 등의 지역에 분포하며, 우리나라 대부분의 산야에서 서식하는 백합과(Lilaceae)에 속하는 덩굴성 관목으로 지역에 따라 명감나무, 매발톱가시, 참열매덩굴, 종가시덩굴 등 다양하게 불리고 있으며, 원예 분야에서는 명개나무 또는 망개나무로 잘 알려져 있다. 잎은 넓은 타원형으로 광택이 있으며 두껍고, 5월에 황록색의 꽃이 피며, 9-10월에 둥근 열매가 빨갛게 익는다. 어린순과 열매는 식용을 하고, 뿌리와 나무는 해열, 해독, 이뇨 등의 증상 완화, 체력증강 및 피부염, 신장염, 방광염, 항균작용, 관절염, 유방암 등에 효과가 있다고 알려져 있다(13-15). 청미래덩굴의 함유 성분으로는 pseudoprotodioscin, dioscin, protodioscin, sieboldogenin, spirostane 와 furostane의 glycoside 등이 있다. 또한 청미래덩굴(*Smilax China* L.)의 근경을 지칭하는 토복령의 성분에 관한 연구는 아직 많지는 않지만 saponin, tannin 등이 주성분이라고 알려져 있으며, 뿌리에서 분리된 배당체 ophiopogonin과 점액성 물질이 많이 포함되어 인체의 면역 증진과 각종 세균의 감염으로부터 장기를 보호하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 또한 중금속 중독에 대한 해독 작용에 효과적이라고 알려져 있다(16,17).

따라서 본 연구에서는 청미래덩굴 추출물의 항산화 및 항당뇨 효과 연구를 통해 여러 분야에서 천연 항산화제 및 항당뇨 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 청미래덩굴은 충북 괴산에서 2012년 봄에 생산된 견채를 구입하여 에탄올과 열수 추출을 실시

하였다. 시료의 에탄올 추출물은 70% 에탄올을 시료의 10배를 첨가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였고, 열수 추출물은 증류수를 시료의 10배를 첨가하여 80°C에서 3시간 가량 환류냉각 추출해 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 동결 건조하여 파우더 상태로 -20°C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

실험 시약

실험에 사용된 시약인 folin-ciocalteu phenol reagent, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), potassium persulfate, xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, AlCl₃, quercetin, tannic acid, pancreatin α -amylase(EC No. 232.565.6), α -glucosidase(EC No. 232.604.7), p -nitrophenol- α -D-glucopyranoside (PNPG) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)는 Wako Pure Chemical Industries. Ltd.(Japan)에서 구입하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 정량은 AOAC(18)를 변형하여 정량하였다. 즉, 시료 용액 50 μ L에 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ L를 가하고 실온에서 3분간 반응시킨 후 0.7 M Na₂CO₃ 용액 50 μ L를 넣어 실온에서 1시간 방치하고, 700 nm에서 흡광도를 측정 후, 표준물질인 tannic acid로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Zhuang 등(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 용액 100 μ L에 2% AlCl₃ ethanol solution 100 μ L을 가하여 실온에서 1시간 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용하였으며, 표준물질의 검량선과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법(20)을 변형하여 측정하였다. DPPH용액(Sigma) 60 μ L와 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료를 120 μ L씩 넣고 혼합한 후 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법(21)에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 ABTS⁺ 100 μ L에 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료 100 μ L를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법(22)을 변형하여 측정하였다. 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료용액을 20 μ L에 tris-HCl 완충용액(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5) 130 μ L와 pyrogallol(7.2 mM) 20 μ L를 취하여 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 산화된 pyrogallol양을 microplate reader를 이용하여 흡광도 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 corte의 방법(23)을 변형하여 측정하였다. 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료용액 100 μ L에 potassium phosphate 완충용액(0.1 M potassium phosphate buffer, pH 8.0) 600 μ L와 xanthine(2 mM)을 녹인 기질액 200 μ L를 첨가하고, xanthine oxidase (0.2 U/mL) 100 μ L를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응정지를 시키고 반응액중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 uric acid 생성량}}{\text{무첨가군의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법(24)에 의하여

행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1M 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 측정 후 표준곡선에서 양을 환산하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

본 실험에 TBARS는 Burge와 Aust의 방법(25)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 1mL에 TBA reagent 2 mL를 가하고 15분간 중탕한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1,000 rpm으로 원심분리 하였다. 원심분리 한 액을 실온에서 10분간 방치 한 후 상등액을 532 nm서 흡광도를 측정하였으며, TBARS 값은 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxy propane(TEP)의 함량을 환산하여 [1-(반응구의 생성량/대조구의 생성량)] \times 100 으로 항산화 활성을 나타내었다.

Antioxidant protection factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(26)으로 측정하였다. 10 mg의 β -carotene을 50 mL chloroform에 용해한 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을 증류시킨 후, 20 μ L linoleic acid, 184 μ L tween 40과 50 mL H₂O₂를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL emulsion을 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료용액 100 μ L에 혼합하여 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, PF는 반응구의 흡광도/대조구의 비로 나타내었다.

α -glucosidase 저해활성 측정

세포를 α -glucosidase 저해활성을 측정하기 위하여 Tibbot 등의 방법(27)에 따라 반응 혼합액은 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 p-nitrophenol- α -D-glucopyranoside (PNPG)를 용해시켜 1 mg/mL의 농도로 기질을 만들었다. 기질 1 mL와 효소액(30 unit) 0.1 mL를 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 mL, 반응구에는 농도별(50, 100, 500 μ g/mL) 시료 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N-NaOH 0.1 mL를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol(PNP)은 400 nm에서 spectro-photometer를 이용하여 측정하였으며, 그 양은 표준물질 p-nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식으로 저해율

을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응군의 PNP 생성량}}{\text{대조군의 PNP 생성량}} \right) \times 100$$

α -amylase 저해활성 측정

α -amylase 저해활성 측정은 agar diffusion 방법(28)을 이용하여 측정하였다. Plate는 5 g의 agar와 5 g의 soluble starch를 500 mL 증류수에 녹인 후 121°C, 15분간 감압 살균하고 15 mL씩 분주하여 제조하였고, 대조군의 경우 0.8 μ L의 증류수 0.2 μ L의 효소(1,000 unit/mL)를 섞고 반응군은 증류수 대신 추출물을 효소와 섞어 plate에 놓인 disc paper 위에 각각 분주하고 37°C에서 3일간 배양한 후 I2/KI(5 mM I2 in 3% KI) 5 mL를 가하여 15분간 발색 후 다음의 식으로 효소 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{대조군의 면적-반응군의 면적}}{\text{대조군의 면적}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

총 폴리페놀 함량 측정 결과

천연 항산화제로서의 기능이 잘 알려진 식물체에는 2차 대사산물의 하나인 페놀성 물질이 있으며, 이 물질은 콜레스테롤저하작용, 항암 및 항산화 작용 등 다양한 항산화 생리활성 기능을 가지고 있다(29). 이에 tannic acid를 기준 물질로 하여 표준곡선을 그린 후 청미래덩굴 에탄올 및 열수 추출물의 폴리페놀 함량을 측정한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 청미래덩굴 에탄올 추출물은 108.4 mg/g, 열수 추출물은 44.6 mg/g으로 청미래덩굴 열수추출물보다 에탄올 추출물에 더 많은 폴리페놀이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Chung 등(30)의 구절초의 꽃, 잎 및 줄기, 뿌리 등 부위별 메탄올 추출물이 각각 17.16 mg/g, 14.75 mg/g, 13.50 mg/g의 폴리페놀을 함유하고 있다는 연구결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 추출물에 더 많은 폴리페놀이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents of 70% ethanol and water extracts from *Smilax china* L.

Sample	Extract	Total phenolics (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)
<i>Smilax china</i> L.	70% EtOH	108.4±0.83	76.2±4.78
	Water	44.6±0.68	35.3±2.11

총 플라보노이드 함량 측정 결과

플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones,

catechins 및 flavonones 등으로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 flavonoid는 항산화, 항암, 항염증, 항노화 등 다양한 생리적 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(31,32). 따라서 quercetin을 기준물질로 하여 표준곡선을 그린 후 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물의 플라보노이드 함량을 측정한 결과 Table 1와 같이 나타났다. 청미래덩굴 에탄올 추출물은 76.2 mg/g, 열수 추출물은 35.3 mg/g의 함량을 나타내었다. 이는 Lee 등(33)의 환삼덩굴의 메탄올 추출물이 13.61 mg/g의 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인한 연구와 Kim 등(34)의 자생식물 26종과 생약 자원 추출물 14종 중 사상자와 흑두에서는 플라보노이드가 검출되지 않았고, 어성초는 1.40 mg/g, 쥐오줌풀은 6.40 mg/g의 플라보노이드를 함유하고 있음을 확인한 연구결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 추출물에 더 많은 플라보노이드가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

전자공여능 측정 결과

전자공여능 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cystein, glutathion과 같은 함 유황아미노산과 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole(BHA) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(35). 청미래덩굴의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 에탄올 추출물과 열수 추출물은 각각 500 μ g/mL에서 43.5%, 35.1%의 활성을 나타내었다. 이는 Kim 등(36)의 천년초 추출물의 80% 에탄올 추출물이 19.7%, 열수 추출물이 6.03%의 활성을 나타내었다는 연구논문과 비교하였을 때 청미래덩굴 에탄올 및 열수 추출물에서 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다.

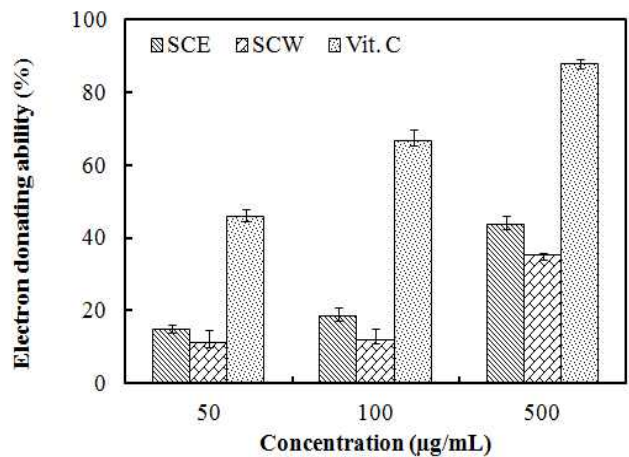


Fig. 1. Electron donating ability of *Smilax china* L. extract.

■ SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 ▨ SCW : Water extract of *S. china*.
 ▩ Vit. C: ascorbic acid
 Result are means±SD of triplicate data.

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정 결과

ABTS radical cation 소거능은 ABTS diammonium salt와

potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색에서 연한 녹색으로 탈색되는 것을 측정하는 방법이다(37). 이러한 방법을 통해서 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물의 ABTS 전자공여능을 측정된 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물은 각각 500 µg/mL에서 75.8%와 73.4%의 소거능이 있음을 확인하였다. 이는 Yu 등(38)의 연구에서 오가피 순 추출물이 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 각각 6.42%, 12.47%, 16.69%의 활성을 확인한 결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 ABTS radical 소거활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

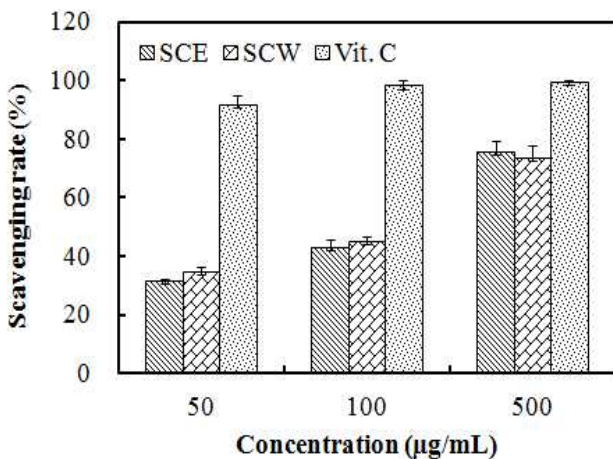


Fig. 2. ABTS+ cation radical scavenging activity of *Smilax china* L. extract.

SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 SCW : Water extract of *S. china*.
 Vit. C: ascorbic acid
 Result are means±SD of triplicate data.

Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정 결과

Superoxide radical 유사활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 측정방법으로 pyrogallol은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 여기에는 superoxide가 관여한다고 알려져 있다(39). SOD는 다른 종류의 항산화제보다 우수한 효과를 나타내기 때문에 의약제제로서 많은 관심을 일으키고 있으며, 현재 항염증 제제나 피부노화방지를 위한 미용제제로 화장품 등에 많이 이용이 되고 있다. 이러한 방법으로 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물의 SOD 유사활성능을 측정된 결과 Fig. 3과 같이 청미래덩굴 500 µg/mL에서 각각 26.3%, 16.8%의 유사활성능을 확인하였다. 이는 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 비교적 낮은 수치였지만 Lee 등(40)의 연구에서 가죽나무 뿌리 추출물이 3.82%, Kim 등(41)의 갈근, 당귀, 감초, 산약 등에서 12.4%의 활성을 확인한 결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 추출물의 SOD 유사활성능이 유의한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

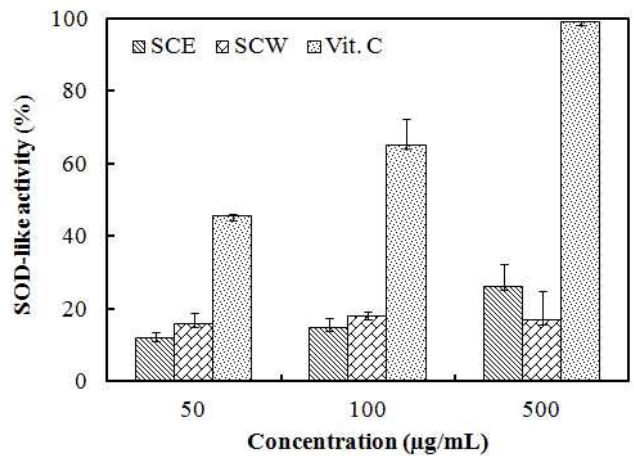


Fig. 3. SOD-like activity of *Smilax china* L. extract.

SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 SCW : Water extract of *S. china*.
 Vit. C: ascorbic acid
 Result are means±SD of triplicate data.

Xanthine oxidase 저해활성 측정 결과

Xanthine oxidase는 생체 내 유리기 생성계의 하나로 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine 으로부터 urate를 형성하며 urate가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍과 신장에 침착되어 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 왔다(42,43). 그 외에 효소활성을 저해할 목적으로 천연물을 대상으로 하는 많은 연구가 진행되어 왔는데, 식물계에 존재하는 flavonoid 류는 hydroxyl기의 위치에 따라 xanthine oxidase 저해효과가 다르며, galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase 저해효과가 우수하였으며 경쟁적으로 저해한다는 사실을 보고하였다(44). 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물의 xanthine oxidase 저해효과를 측정된 결과 Fig. 4와

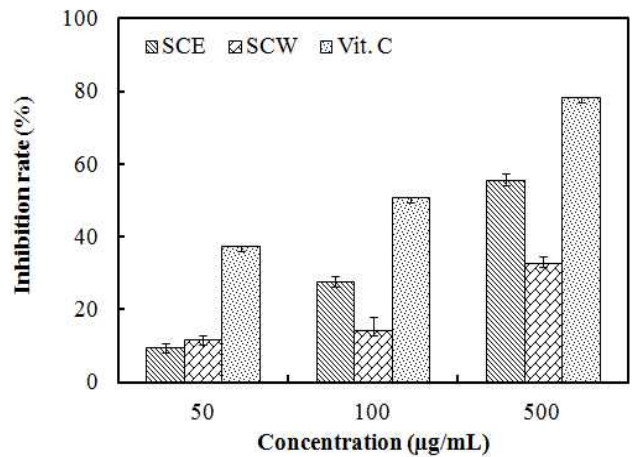


Fig. 4. Inhibition rate of *Smilax china* L. extract on xanthine oxidase.

SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 SCW : Water extract of *S. china*.
 Vit. C: ascorbic acid
 Result are means±SD of triplicate data.

같이 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 55.2%, 32.6%로 청미래덩굴 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 높은 활성을 보였다. 이는 Yoon 등(45)의 미숙, 완숙 및 과숙 딸보리수 열수 추출물이 각각 32.8%, 11.2% 및 5.0%의 활성을 나타낸 연구결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성 측정 결과

ACE은 angiotensin I에서 혈관수축 작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II로 변화하는 단계에 관여하는 효소이다. angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다(46). 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물이 고혈압의 발생기작에서 ACE저해 작용을 통한 고혈압 억제 활성을 측정한 결과 Fig. 5에서와 같이 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물은 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 69.4%, 48.3%의 저해율을 보였다. 이는 Choi 등(47)의 연구에서 측정된 약용식물 중에서 행인, 백작약, 두충, 강활, 향부자등이 각각 21.3%, 16.9%, 28.4%, 18.9%, 8.89%의 저해활성을 확인한 결과와 비교하였을 때 본 연구에 이용된 청미래덩굴 추출물의 ACE 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

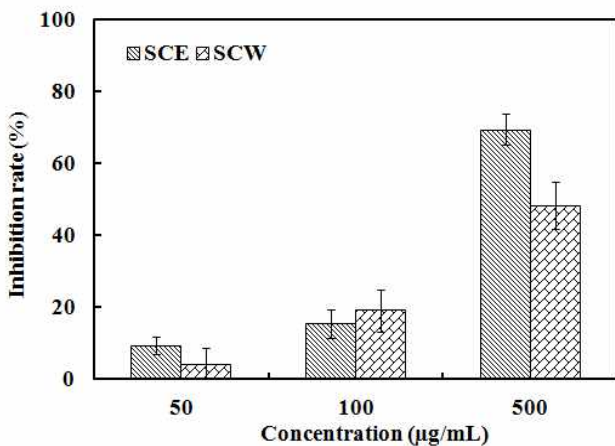


Fig. 5. Inhibition rate of *Smilax china* L. extract on ACE.

■ SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 ▨ SCW : Water extract of *S. china*.
 Result are means \pm SD of triplicate data.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정 결과

지방산패도를 나타내는 TBARS 값은 TBA시약과 반응하여 붉은색을 띄는 malondialdehyde(MA)의 생성량을 나타낸 것이다(25). 청미래덩굴 추출물을 첨가하여 TBARS를 측정한 결과 Fig. 6과 같이 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 82.2%, 63.2%의

억제율을 확인하였다. 이는 Kim 등(48)의 연구에서 산삼배양근의 열수 추출물 및 70%에탄올 추출물이 1~20 mg/mL의 농도에서 열수 추출물은 4.74~24.88%, 70% 에탄올 추출물은 9.18~66.59%의 억제능을 나타내었다는 결과와 비교하였을 때 청미래덩굴의 지질산패 억제능이 높은 것을 확인할 수 있었다.

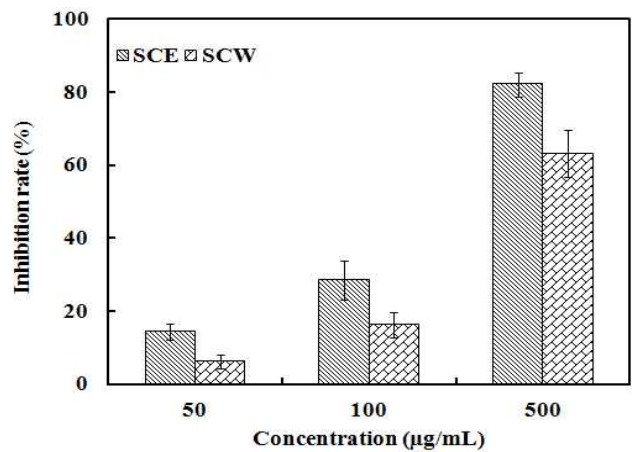


Fig. 6. Effect of extract from *Smilax china* L. on TBARS.

■ SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 ▨ SCW : Water extract of *S. china*.
 Result are means \pm SD of triplicate data.

Antioxidant protection factor(PF) 측정 결과

β -carotene은 주로 lipoprotein과 같은 지방친화성 구조의 내부에 존재하면서 지질 산화과정에서 생성되는 peroxy radical과의 반응으로 생성된 불활성물질로 인해 free radical에 의한 연쇄반응을 중단시켜 singlet oxygen을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있다(49). 청미래덩굴 추출물의 지용성 물질에 대한 항산화력을 측정하기 위해 PF를 측정

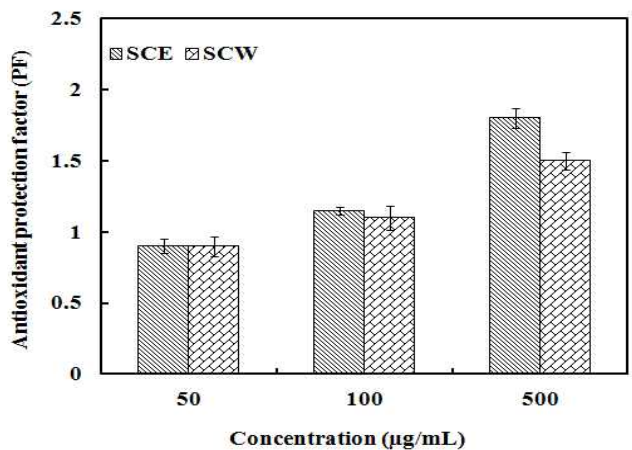


Fig. 7. Effect of extract from *Smilax china* L. on antioxidant protection factor.

■ SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 ▨ SCW : Water extract of *S. china*.
 Result are means \pm SD of triplicate data.

한 결과 Fig. 7에서와 같이 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물 500 µg/mL에서 각각 1.8 PF, 1.5 PF값을 나타내었다. 이는 Kim 등(50)의 연구에서 진범의 에탄올 추출물과 열수 추출물이 500 µg/mL 이상의 농도로 첨가하였을 때 에탄올 추출물은 1.4~1.49 PF, 열수 추출물은 1.27~1.33 PF값을 나타낸 결과와 비교하였을 때 청미래덩굴 추출물의 지용성물질에 대한 항산화력이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

α-glucosidase 저해활성 측정 결과

α-glucosidase는 소장점막의 미세융모막에 존재하는 효소로서 다당류의 탄수화물을 단당류로 분해하는 탄수화물의 소화와 흡수에 필수적인 효소로서 경구혈당강하제로 사용되고 있다(51). 이 효소의 활성을 저해시킴으로서 체내의 포도당 흡수를 억제시켜 식후 혈당상승을 감소시킬 수 있으며, 저혈당의 부작용을 일으키지 않는 큰 장점을 가질

수 있어 α-glucosidase저해 물질의 탐색은 매우 유용하다(52). 청미래덩굴 추출물의 α-glucosidase 저해활성을 측정 한 결과 Fig. 8(a)와 같이 에탄올 추출물과 열수 추출물은 500 µg/mL의 농도에서 각각 13.6%, 11.2%의 저해활성을 보였다. 이는 다소 낮은 활성이지만 Kim 등(53)의 강원도 자생 산채 추출물 중 홀아비꽃대, 국화수리취, 뽕꼭채, 사철쑥의 에탄올 및 열수 추출물이 각각 8.1%, 4.0%, 2.8%, 4.5%, 8.3%, 11.1%, 7.9%, 9.9%의 저해율을 보인 연구결과와 비교하였을 때 유사한 활성을 나타내었다.

α-amylase 저해활성 측정 결과

사람이 탄수화물을 섭취하면 이를 분해하기 위해 가장 먼저 작용하는 소화효소가 타액의 α-amylase와 췌장내의 α-amylase로 탄수화물의 소화에 있어서 중요한 효소이다. 이 효소를 저해시킴으로서 탄수화물의 소화 속도를 지연시켜 식후 혈당 상승을 억제할 수 있다(54). 청미래덩굴 추출물의 α-amylase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 8(b)와 같이 청미래덩굴 에탄올 추출물과 열수 추출물 500 µg/mL의 농도에서 각각 17.9%, 15.9%의 저해활성을 나타내었다. Kim 등(53)은 모시대, 미역취, 만병초의 에탄올 추출물과 열수 추출물이 각각 5.2%, 3.7%, 15.5%, 10.1%, 26.8%, 17.4%의 저해율이 있다고 보고하였으며, 이는 청미래덩굴 추출물의 α-amylase 저해활성과 유사한 결과를 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 백합과에 속하는 덩굴성 관목인 청미래덩굴 70% 에탄올 추출물과 열수 추출물의 항산화 및 항당뇨에 대한 활성을 연구하였다. 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량 측정, 전자공여능, ABTs 소거능, SOD 유사활성능, xanthine oxidase 저해활성, ACE 저해활성, TBARs 측정, PF값 측정 및 α-glucosidase 와 α-amylase 의 저해활성을 측정하였다. 그 결과 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 에탄올 추출물에 함유량이 더 많았으며, 전자공여능, ABTs 소거능, SOD 유사활성능, xanthine oxidase 저해활성, ACE 저해활성, TBARs 측정, PF값 측정 결과 모두 청미래덩굴 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 활성이 우수하였다. 또한 α-glucosidase 와 α-amylase 의 저해활성을 측정한 결과 에탄올 추출물의 활성이 열수 추출물보다 우수하였다. 이상의 검증 결과를 종합하여 볼 때 청미래 덩굴의 에탄올 추출물의 항산화 및 항 당뇨 활성이 우수하였고, 차후 항산화 및 항 당뇨 예방물질 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에

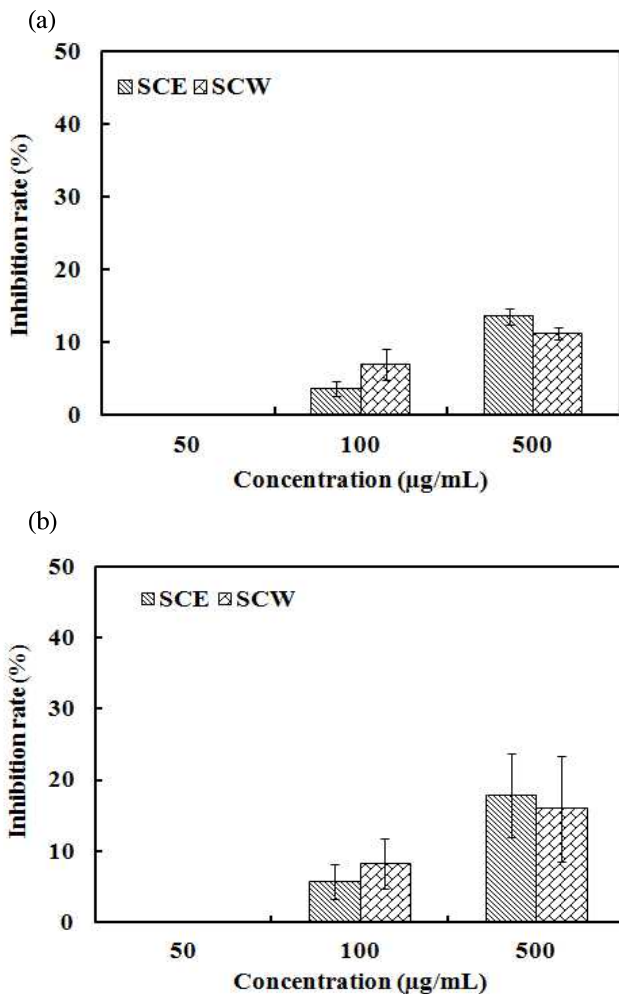


Fig. 8. Inhibition rate of *Smilax china* L. extracts on α-glucosidase (a) and α-amylase (b).

■ SCE : Ethanol extract of *S. china*.
 ▨ SCW : Water extract of *S. china*.
 Result are means ± S.D. of triplicate data.

의하여 이루어진 것임.(과제고유번호: HN10C0014)

References

- Papa S, Skulachev VP (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem*, 174, 305-319
- Kang KA, Chae SW, Kang DG, Kim JS, Hyun JW (2005) Screening of antioxidative effect of herbal extracts on oxidative stress. *Korean J Pharmacogn*, 36, 159-163
- Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI (2005) The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 48, 103-108
- Attele AS, Zhou YP, Xie JT, Wu JA, Zhang L, Dey L, Pugh W, Rue PA, Polonsky KS, Yuan CS (2002) Antidiabetic effects of *Panax ginseng berry* extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, 51, 1851-1858.
- Steiner G, Haynes FJ, Yoshino G, Vranic M (1984) Hyperinsulinemia and *in vivo* very-low-density lipoprotein-triglyceride kinetics. *Am J Physiol*, 246, 187-92.
- Young IR, Stout RW (1987) Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall: Interaction of insulin with dibutyryl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. *Diabete Metab*, 13, 301-316
- LaSalle JR (2010) Reaching HbA1c goals with saxagliptin in combination with other oral antidiabetic drugs. *Postgrad Med*, 122, 144-152
- Jeong IK, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW, Chung YE, Park JY, Hong SK, Lee KU (2002) Comparative study about the effects of acarbose and voglibose in type 2 diabetic patients. *J Korean Diabetes Assoc*, 26, 134-145
- Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J, Fujii H, Fukui H (2008) Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*, 14, 6087-6092
- Jeong HJ, Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ (2010) Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbal extracts according to extraction methods. *Korean J food Sci Technol*, 42, 571-577
- Lee EH, Ham JY, Ahn HR, Kim MC, Kim CY, Pan CH, Um BH, Jung SH (2009) Inhibitory effects of the compounds isolated from *Sargassum yezeoense* on α -glucosidase and oxidative stress. *Korean J Pharmacogn*, 40, 150-154
- Xu ML, Hu JH, Wang L, Kim HS, Jin CW, Cho DH (2010) Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S. et Z. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 18, 34-39
- Shao B, Guo H, Cui Y, Ye M, Han J, Guo D (2007) Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, 68, 623-630
- Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY (2006) Antioxidant activity of extracts from *Smilax China* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 35, 1133-1138
- Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q (2010) Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax China* L. *J Ethnopharmacol*, 130, 460-464
- Kim SW, Chung KC, Son KH, Kang SS (1989) Steroidal saponins from the Rhizomes of *Smilax china*. *Korean J Pharmacogn*. 20,76-82
- Yang KH (2004) Studies on the antioxidation and antimicrobial effect of *Smilacis glabrae rhizome*. *J Korean Oriental Med*, 25, 1-8
- Association of analytical chemists (1984) Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): Association of analytical chemists INC.
- Zhuang XP, Lu YY, and Yang GS (1992) Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herb Med*, 23, 122-124
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1120
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47, 469-474
- Corte ED, Stirpe F (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J*, 126, 739-745
- Cushman DW, Ondetti MA (1980) Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem Pharmacology*, 29, 1871-1877

25. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol*, 105, 302-310
26. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.) *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780
27. Tibbot BK, Skadsen RW (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol*, 30, 229-241
28. Cavidson PH, Parish ME (1989) Methods of testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol*, 43, 148-150
29. Kim HJ, Jun BS, Choi ML, Cho YS (2000) Antioxidative activities by water-soluble extracts of morus alba and cudrania tricuspidata. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 43, 148-152
30. Chung HJ, Jeon IS (2011) Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean J Food Preserv*, 18, 739-745
31. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem*, 40, 1591-1598
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, 22, 375-383
33. Lee YR, Kim KY, Lee SH, Kim MY, Park HJ, Jeong HS (2012) Antioxidant and antitumor activities of methanolic extracts from *Humulus japonicus*. *Korean J Food Nutr*, 25, 357-361
34. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH (2012) Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*, 44, 337-342
35. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS (2006) Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. inermis Rehder. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 128-134
36. Kim DJ, Jung JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH (2011) Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Preserv*, 18, 366-373
37. Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK (2009) ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* sing (Pine mushroom). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 555-560
38. Yu SY, Lee YJ, Song HS, Hong HD, Lim JH, Choi HS, Lee BY, Kang SN, Lee OH (2012) Antioxidant effects and nitrite scavenging ability of extract from *Acanthopanax cortex* Shoot. *Korean J Food Nutr*, 25, 793-799
39. Eugene F, Roth J, Harriet SG (1983) The pyrogallol assay for superoxide dismutase: absence of a glutathione artifact. *Anal Biochem*, 137, 50-53
40. Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW (2007) Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 1113-1119
41. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*, 36, 333-338
42. Storch J, Ferber E (1988) Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal Biochem*, 169, 262-267
43. Hatano T, Yasuhara T, Fukuda T, Noro T, Okuda T (1989) Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem Pharm Bull*, 37, 3005-3009
44. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP (1973) Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Eur J Biochem*, 187, 131-140
45. Yoon KY, Hong JY, Nam HS, Moon YS, Shin SR (2007) Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of hot-water extracts from fruits of *Elaeagnus multiflora* Thunb. in maturity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36, 14-19
46. Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W (2002) Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods*, 51, 75-87
47. Choi GP, Chung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH, Kim JD (2002) Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 10, 399-402
48. Kim JW, Lee SH, No HK, Hong JH, Youn KS (2010) Antioxidant properties of cultured wild ginseng roots extracts. *Korean J Food Preserv*, 17, 861-866
49. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and

- Agrobacterium-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem*, 47, 1776-1780
50. Kim JH, Lee SY, Kwon OJ, Park JH, Lee JY (2013) Anti-aging and anti-diabetes effects of *Aconitum pseudo-leave* var. *erectum* extracts. *J Life Sci*, 23, 616-621
51. Standl E, Baumgartl HJ, Fchtenbusch M, Stemplinger J (1999) Effect of acarbose on additional insulin therapy in type 2 diabetic patients with late failure of sulphonylurea therapy. *Diabetes Obes Metab*, 1, 215-220
52. Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP (2009) Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 989-995
53. Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM (2011) Screening of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon-do wild plants extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 308-315
54. Xu ML, Wang L, Xu GF, Wang MH (2011) Antidiabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L.) Hill extract. *Korean J Pharmacogn*, 42, 61-67

(접수 2013년 11월 08일 수정 2014년 2월 25일 채택 2014년 3월 25일)