

蒼耳子로부터 안지오텐신 전환효소 억제 유효 성분의 분리

이윤미¹ · 강대길^{1,2} · 김명규¹ · 장지연¹ · 이호섭^{1,2*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 의약자원연구소

Isolation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Component from the Seeds of *Xanthium strumarium*

Yun Mi Lee¹, Dae Gill Kang^{1,2}, Myung Gyu Kim¹, Ji Yeon Jang¹, Ho-Sub Lee^{1,2*}

1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: Medicinal Resources Research Institute (MeRRI), Wonkwang University

In the courses of in vitro screening for the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the various extracts from medicinal plants, n-BuOH soluble extract of the seeds of *Xanthium strumarium* was found to exhibit distinctive angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Bioassay-guided fractionation and purification of the n-BuOH soluble extract of the seeds of *Xanthium strumarium* afforded a new xanthiazone-11-β-glucopyranoside. The ACE activity was significantly inhibited by the addition of a new xanthiazone-11-β-glucopyranoside in a dose-dependent manner of which IC₅₀ value was 21.8 μg/ml.

Key words : angiotensin converting enzyme (ACE), *Xanthium strumarium*, xanthiazone-11-β-glucopyranosidein

서 론

안지오텐신 전환효소 (Angiotensin converting enzyme, EC.3.4.1.15)는 angiotensin I을 생리 활성이 있는 angiotensin II로 전환 시킨다. 안지오텐신 전환효소는 허파, 심장, 신장과 같은 다양한 조직 및 혈장등에 분포하여 Angiotensin II를 생성시키고 이 때 생성된 Angiotensin II는 혈관을 수축하고, 부신 피질의 사구대에서 알도스테론의 분비를 증가시켜 신장내 염의 저류를 유발시켜 세포외액을 증가하게 함으로서 혈압을 증가시켜 혈압을 증가시킨다¹⁾. 또한 안지오텐신 전환효소는 chymase와 본체가 같은 데 kallikrein/kinin system에서 혈관 이완 물질인 bradykinin의 C-말단을 분해하여 혈관 이완을 억제함으로써 혈압을 증가시킨다²⁾. 그러므로 안지오텐신 전환효소 억제제는 angiotensin II의 생성과 bradykinin의 분해를 억제시켜 혈압을 강하시킬 수 있는 방법으로 이용되고 있으며, 현재는 captopril, enalapril, lisinopril 및 ternocapril 등이 개발되어 임상에서 이용되고 있다. 고혈압, 울혈성 심부전, 심근 경색, 당뇨병 신염, 신부전 등과 같은 순환계 관련 질환들은 안지오텐신 전환 효소 억제제 투여에 의하여 증상

이 호전된다. 최근 연구에서는 한약들 비롯한 다양한 식물 자원에서 안지오텐신 전환효소 억제제를 개발하기 위하여 활성 식물의 탐색 및 유효 성분 분리에 관한 많은 연구 결과들이 발표되었다.

윤 등³⁾ 한약에서 많이 이용되는 27종의 생약으로부터 안지오텐신 전환효소 억제제를 검색하여 고사리, 박하, 운모향 등의 추출물이 안지오텐신 전환효소 억제 활성도가 높다는 것을 보고하였다. 또한 강 등⁴⁾은 한약재의 용매 추출물을 대상으로 안지오텐신 전환 효소 억제 활성을 탐색한 결과, 택사의 물층, 황련의 butanol, 물 추출물과 단삼의 ethylacetate, butanol 추출물, 토사자의 ethylacetate 추출 등이 안지오텐신 전환 효소 억제 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다. Inokuchi 등^{5,6)} 또한 일본의 전통 생약과 중의학에서 고혈압과 관련이 있다고 알려진 생약 65가지를 50% methanol로 추출하여 안지오텐신 억제제를 검색한 바 있다. 또한 인도⁷⁾, Reunion 섬⁸⁾, 남아프리카⁹⁾, 남아메리카¹⁰⁾ 등에서 자생하는 생약재 추출물에서 안지오텐신 전환효소 억제제를 탐색하여 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있는 식물들을 밝힌 바 있다.

최근 우리는 한약재를 대상으로 안지오텐신 전환 효소 억제 활성을 탐색한 결과 창이자의 butanol 추출물이 안지오텐신 전환 효소를 뚜렷하게 억제하는 것을 확인하였다. 창이자는 국화과의 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.) 또는 대꼬리의 열매이며 우리나라의 들판에 널리 분포하는 일년생 초본으로 일본, 만주, 중국, 대만, 필리핀 등 아시아, 유럽, 북아메리카에 분포 한다^{11,12)}.

* 교신저자 : 이호섭, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : host@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6841

· 접수 : 2004/12/01 · 수정 : 2004/12/31 · 채택 : 2005/01/26

한방에서 창이자는 악성 종양에 진통제로도 사용하고 창이자 불추출물은 만성 비염, 관절염, 신경통, 면역 기능을 활성화하는 작용이 있다는 보고도 있다^{10,13}. 최근에 이 등¹⁴은 창이자로부터 항산화 활성이 있는 caffeic acid와 3,5-di-O-caffeoylquinic acid를 분리한바 있다. 그러나 창이자의 안지오텐신 전환 효소 억제 활성에 관한 연구는 현재까지 보고 된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 창이자로부터 안지오텐신 전환 효소억제 활성이 있는 유효 성분을 분리하여 화학구조를 결정 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Thin layer chromatography (TLC)는 silica gel plate (0.25 mm, polygram sil N-HR/UV254, E. Merck, Germany)를 사용하였으며, silica gel (Kiesel 60, 230-400 mesh)은 Merck제품을, sand는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 이용했고, glass column (3.5 cm x 25 cm, Korea)을 사용했다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC, CAVRO, model MSP 9000, USA)를 사용하였고, HPLC로 분리된 물질은 NMR Spectrophotometer (JEOL-ECP 500, Japan)를 사용하였으며, chemical shift는 ppm으로, 내부표준물질은 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, 용매는 D₂O, acetone-d₆를 사용하였다. 창이자추출을 위해 사용된 용매로는 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, MeOH, 3차 증류수를 사용했으며, 여과를 위해 filter paper (Whatman No.4: 110 mm)를 사용했다. 감압농축을 위해 회전식 진공 농축기(Eyela, Japan)를 이용하였다. 안지오텐신 전환효소 활성도 측정에 사용된 Hip-His-Leu, o-phthalaldehyde는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였고, Fluorescence spectrophotometer (Hitachi F2500, Japan)를 이용하여 안지오텐신 전환효소 활성도를 측정하였다

2. 추출 및 분리

1) 실험 재료

본 실험에 사용한 추출용 시료 창이자(Xanthium strumarium L.)는 전북 익산의 한약 건재상에서 건조된 것을 구입하여 미세하게 분쇄한 뒤 추출용 시료로 사용하였다.

2) 용매에 의한 분획

창이자를 잘게 세절하여 음건한 후 1.2 kg을 MeOH 3 l로 상온에서 1주일 추출하여 MeOH엑스(57.4 g)를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 물에 현탁시킨 후 n-hexane, EtOAc, BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획 물들을 농축하여 hexane 분획(7.8 g), EtOAc 분획 (2.7 g), BuOH 분획 (9.6 g)을 얻었다.

3) 생리 활성물질의 분리

n-BuOH 추출물 9.6 g을 100 ml 둥근 플라스크에 넣고, MeOH (20 ml)을 넣어 녹인 후, silica gel 4.0 g을 넣어 용매를 감압 증류시켜 silica gel에 loading 시켰다. loading된 n-BuOH 추출물을 다시 silica gel 60 g이 충전된 column에 넣어 MeOH과 H₂O로 용리시켜 분획을 얻어 용매를 감압 농축 시켜, 분획 1

(4.358 g), 분획 2 (2.347 g), 분획 3 (300 mg), 분획 4 (144 mg), 분획 5 (373 mg), 분획 6 (584 mg), 분획 7 (166 mg)을 얻었다. 이들 7개의 분획 중 높을 수율을 보이는 분획-2를 C₁₈ column chromatography를 이용하여 분리 하였다. 분획 2의 2.347 g을 100 ml 둥근 플라스크에 넣고, MeOH (5 ml)을 넣어 녹인 후, C₁₈ gel 1 g을 넣어 용매를 감압 증류시켜 C₁₈ gel에 loading 시켰다. loading시킨 분획 2를 다시 C₁₈ gel 60 g이 충전된 Flash column에 넣어 MeOH과 H₂O로 용리 시켜 분획 2-1 (20.1 mg), 분획 2-2 (24.9 mg), 분획 2-3 (120.8 mg), 분획 2-4 (129.3 mg), 분획 2-5 (312.2 mg), 분획 2-6 (141.7 mg), 분획 2-7 (98.3 mg), 분획 2-8 (69.9 mg), 분획 2-9 (39.9 mg), 분획 2-10 (30.1 mg), 분획 2-11 (50.7 mg), 분획 2-12 (123.6 mg), 분획 2-13 (203.6 mg)을 분리하였다 (Fig. 1). 위의 분리한 13개의 분획을 TLC로 확인하고 안지오텐신 전환효소 활성 실험을 한 결과, 활성이 나타난 분획 8과 분획 9를 합하여 reversed-phase HPLC를 이용하여(gradient from 50 to 100% CH₃CN in H₂O over 40min) 순수 화합물 3을 얻었다.

4) 유효 성분의 구조분석

창이자의 추출물로부터 순수하게 얻어진 화합물 3의 화학 구조 동정에는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 이용하여 분석하였다.

3. 안지오텐신 전환효소의 활성도 측정

안지오텐신 전환효소 활성도는 Santos 등¹⁵ 방법을 변용하여 사용하였다. 10 μ l의 혈장을 5 mM Hip-His-Leu (in 0.4 M sodium borate buffer, pH 8.3)가 들어있는 490 ml의 assay buffer에 넣어 37 °C에서 15분간 반응시켰다. 이 반응을 정지시키기 위해 1.2 ml의 0.34 N NaOH를 넣고 여기에 형광물질을 생성시키기 위해 100 μ l의 o-phthalaldehyde 용액 (20% 농도로 methanol에 녹임)을 넣고 10분 후에 3 N HCl 200 μ l를 첨가하여 혼합하였다. 실온에서 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 마지막 생성물인 His-Leu을 excitation 365 nm, emission 495 nm의 파장에서 spectrofluorimeter로 측정하였다. 표준 곡선은 His-Leu를 이용하여 작성하였으며 음성 대조군은 혈장을 반응시키기 전에 NaOH를 먼저 넣어 시행하였다.

실험 결과

1. 안지오텐신 전환효소 억제 유효 성분의 분리

창이자로부터 안지오텐신 전환 효소를 억제하는 유효 성분을 분리하기 위하여 methanol로 추출한 후 n-hexane, ethylacetate, n-butanol, 물 등의 용매를 이용해 분획하였고 이어서 크로마토 그래피를 이용하여 유효성분을 분리하였다 (Fig. 1). 그 결과 나온 분획물 (400 μ g/ml)의 안지오텐신 전환효소 억제 활성도는 n-hexane, ethylacetate, n-butanol, 물 분획 층이 각각 1.2, 51.3, 55.5, 26.2%로 n-butanol 층이 가장 높았다. 안지오텐신 전환효소 억제 효소 억제 활성이 가장 큰 n-butanol층을 대상으로 silica gel 크로마토그래피를 수행하여 7개의 분획을 얻었다. 1번 - 7번까지 분획물 (200 μ g/ml)의 안지오텐신 전환효소 억제 활성은 각각 28.2, 56.2, 46.1, 19.5, 9.5, 12.8, 1.2%로 2번과 3번 분

획이 가장 높았다. 2번과 3번 분획을 모아 농축한 후 C₁₈ column chromatography를 수행한 결과 13개의 분획이 얻어졌으며 이들 분획 (100 µg/ml) 의 안지오텐신 전환효소 억제 활성은 각각 4.4, 17.7, 22.1, 29.5, 37.1, 29.4, 48.1, 72.3, 68.9, 41.4, 16.9, 10.7, 1.0% 로 8번과 9번 분획의 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 가장 컸다 (Fig. 2). 이 분획들 모아 HPLC를 수행하여 순수 화합물 3을 얻었다.

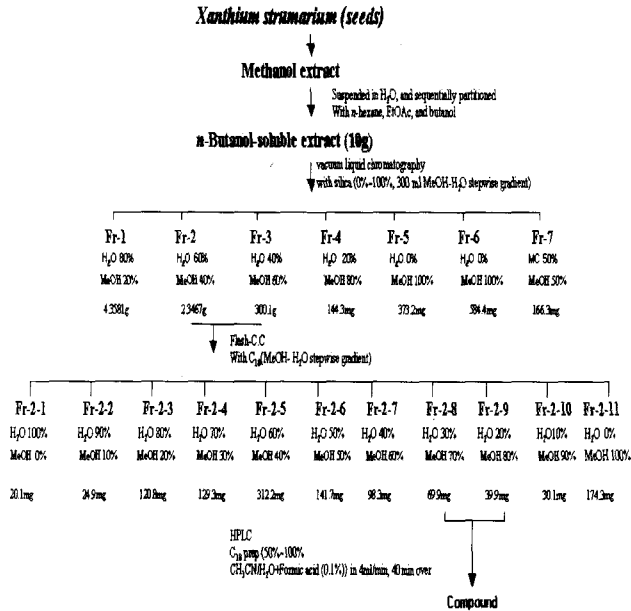


Fig. 1. Extraction and isolation procedures for angiotensin converting enzyme inhibitory active principle from the seeds of *Xanthium strumarium*

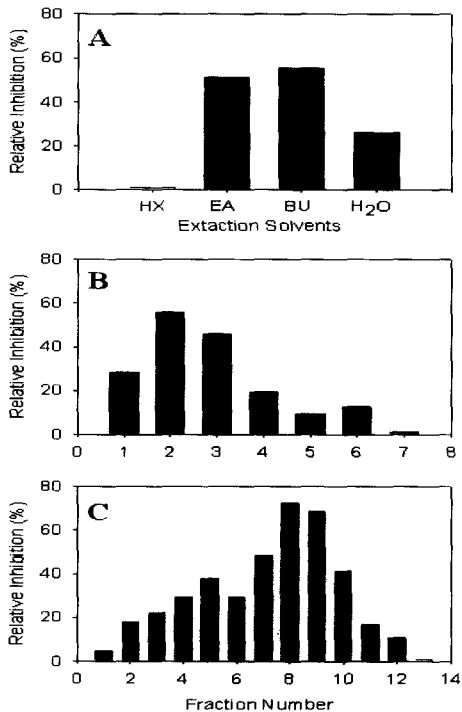


Fig. 2. Inhibition of angiotensin converting enzyme during the isolation procedures. Solvent partition (A), silica gel chromatography (B), and C₁₈ column chromatography (C).

2. 안지오텐신 전환효소 억제 유효 성분의 구조분석

여러 분리 단계를 거친 후 순수하게 얻어진 창이자의 추출물의 화학 구조 동정에는 NMR을 사용하였다. 이 화합물에 대한 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR data는 Table 1과 같다. 이 data를 근거로 화학 구조를 분석한 결과 xanthiazone-11-β-glucopyranoside이라는 지금까지 알려지지 않은 새로운 화합물이라는 밝혀졌다(Fig. 3).

Table 1. NMR data of a Xanthiazone-11-β-glucopyranoside

C/H	Compound		
	δc	δH(int, mult., J in Hz)	HMBCb(13C no.)
1			
2	28.26	3.48(3H, s)	2,8a,5
3	175.78		
4'	129.53		
5	162.81		
6	121.69	6.62(1H, s)	8,11,6,4a
7	166.15		
8	42.04		
8'	139.83		
9	26.58	1.44(3H, s)	9,10,8,8a,7
10	26.58	1.42(3H, s)	9,10,8,8a,7
11	66.37	4.55(1H, dd, J=0.9, 1.35) 4.76(1H, dd, J=1.4, 1.35)	1',6,7 1',6,7
1"	103.05	4.40(1H, d, J=7.8)	11
2"	73.79	3.28(1H, m)	1',3'
3"	76.84	3.39(1H, m)	4',3'
4"	70.46	3.30(1H, m)	3',5'
5"	76.72	3.30(1H, m)	
6"	61.67	3.63(2H, d, J=11.9) 3.82(2H, d, J=11.9)	5',5'

Data were recorded using an acetone-d₆ solution at 500 MHz(1H) and 125 MHz(13C)

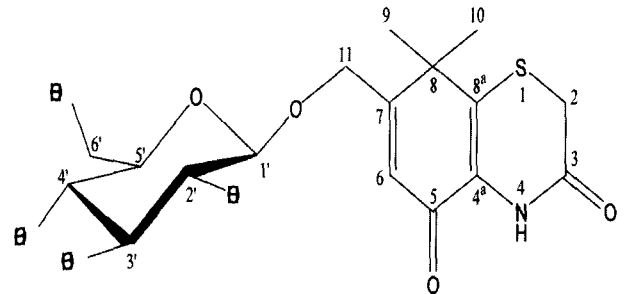


Fig. 3. Chemical structure of xanthiazone-11-β-glucopyranoside

3. Xanthiazone-11-β-glucopyranoside이 안지오텐신 전환 효소 활성도에 미치는 영향

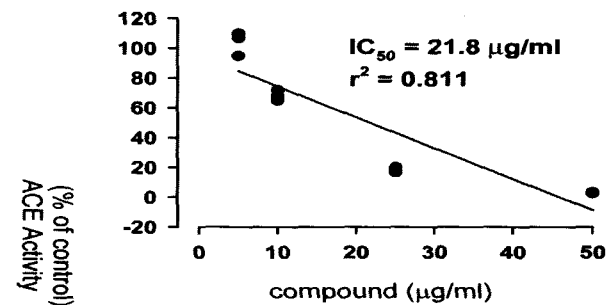


Fig. 4. Dose-dependent inhibition of angiotensin converting enzyme activity by xanthiazone-11-β-glucopyranoside isolated from the seeds of *Xanthium strumarium*

참이자로부터 순수 분리된 xanthiazone-11- β -glucopyranoside의 안지오텐신 전환 효소 억제 활성도를 측정 한 결과 50% 억제 농도 (IC₅₀) 값은 21.8 μ g/ml 이었다 (Fig. 4).

고 찰

최근 경제발전 에 따른 생활수준의 향상으로 식생활이 서구적으로 변화되어 만성 성인병이 증가되고 이에 따라 고혈압의 발생도 증가 추세에 있다. 고혈압은 우리나라에서 암 다음으로 많이 발생하는 대표적 질환의 하나로 그 원인은 renin-angiotensin계가 중요한 역할을 하며 여기에는 안지오텐신 전환효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 생체 내에 존재하는 불활성 angiotensin I은 안지오텐신 전환효소에 의해 dipeptide가 떨어져 나감으로 angiotensin II로 전환되며 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제한다. 또한 혈관이완작용을 갖는 bradykinin을 불활성화 시켜 혈압을 상승시키는 역할을 한다¹²⁾. 현재는 captopril, enalapril, lisinopril 및 ternocapril 등이 안지오텐신 전환효소 억제제로 있으며 고혈압, 울혈성 심부전, 심근경색, 당뇨병 신염, 신부전 등의 치료제로 사용되고 있다. 최근 연구에서 다양한 한약재 및 약용 식물로부터 안지오텐신 전환효소 억제제를 개발하기 위하여 많은 연구 결과들이 발표되었다. 이러한 연구들 중에는 천연 약물에서 안지오텐신 전환효소 억제 활성을 측정하는 연구와 이미 검색된 자료를 이용하여 유효 성분을 분리하는 연구들이 수행되었다.

한약재 및 천연물로 분리된 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있는 유효 성분으로는 토사자에서 분리한 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid, methyl 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid, methyl 3,4-Di-O-caffeoylquinic acid, methyl 3,4-Di-O-caffeoylquinic acid 등의 polyphenol형 화합물¹⁶⁾, 미선나무로부터 분리된 acteoside, isoacteoside, rutin, hirsutrin 등의 배당체¹⁷⁾, 단삼으로부터 분리된 lithospermic acid B¹⁸⁾, 패모로부터 분리된 verticinone, verticine, peimisine 등의 alkaloid 화합물¹⁹⁾, 칠수로부터 분리된 butein²⁰⁾, 황련으로부터 분리한 berberine²¹⁾, 들나물로부터 분리한 quercetin-3-O-alpha-(6''-caffeoylglucosyl-beta-1,2-rhamnoside), quercetin 3-O-alpha-(6''-p-coumaroylglucosyl-beta-1,2-rhamnoside), isorhamnetin-3-beta-glucopyranoside, quercetin-3-beta-glucopyranoside, and kaempferol-3-alpha-arabinopyranoside 등 5종의 flavonoid 배당체²²⁾, 쥐오동으로 분리된 acteoside, leucosceptoside A, martynoside, acteoside isomer, isomartynoside 등의 화합물 등²³⁾ 이 있고, tannin²⁴⁾, proanthocyanidins^{25,26)}, flavonoids²⁵⁻²⁸⁾, xanthenes²⁹⁾, fatty acid²⁸⁾, terpenoids²⁹⁾, oligosaccharides³⁰⁾ peptides^{22,31)} 계통의 화합물들이 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있다고 보고하였다. 본 연구에서 참이자의 안지오텐신 전환효소를 억제하는 성분을 분리하기 위하여 극성이 서로 다른 용매를 이용하여 분획한 결과 n-BuOH층에서 활성도가 가장 높았다. 순수 화합물을 얻기 위해 n-BuOH 추출물을 silica column chromatography와 C18 column chromatography를 이용하여 가장 높은 화합물을 분리한 후 NMR로 화학 구조를 분석한 결과

xanthiazone³²⁾의 유도체인 xanthiazone-11- β -glucopyranoside임이 확인되었다. 분리된 xanthiazone-11- β -glucopyranoside는 농도 의존적으로 안지오텐신 전환효소를 억제하였다. 따라서 이는 혈압 강하효과에 작용할 것으로 사료된다.

결 론

참이자로부터 용매 분획 그리고 세 단계의 크로마토그래피를 이용하여 안지오텐신 전환효소 억제 활성 유효 성분을 순수 분리하였고, 이 화합물의 화학 구조를 결정 한 결과 xanthiazone-11- β -glucopyranoside임을 확인할 수 있었다. Xanthiazone-11- β -glucopyranoside의 안지오텐신 전환효소 억제 활성을 나타내는 IC₅₀는 21.8 μ g/ml이었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행됨.

참고문헌

- Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 73-94, 1976.
- Stewart JM, Ferreira SH, Greene LJ. 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(7): 1557-1567, 1971.
- Yun HS, Chung SH, Han BH. Screening of Plant Materials for the inhibitory activities against angiotensin converting enzyme. *Kor. J. Pharmacog.* 12(1): 51-54, 1981.
- 강대길, 오현철, 손은진, 권태오, 이호섭. 한약재들의 안지오텐신 전환효소 억제 작용 검색. *대한한약학회지* 22(2):1-6, 2001.
- Inokuchi J, Okabe Hm, Yamauchi T, Magamatsu A., Inhibitors of angiotensin converting enzyme in crude drugs I. *Chem. Pharm. Bull.* 32(9): 3615-3619, 1984.
- Inokuchi J, Okabe H, Yamauchi T, Nagamatsu A, Nonaka G, Nishioka I. Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu* L. *Life Sciences* 38: 1375-1382, 1986.
- Nyman U, Joshi P, Madsen LB, Pedersen TB, Pinstrup M, Rajasekharan S, George V, Pushpangadan P. Ethnomedical information and in vitro screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India) *J. Ethnopharmacol.* 60: 247-263, 1998.
- Adersen A, Adersen H. Plants from reunion island with alleged antihypertensive and diuretic effects-an experimental and ethnobotanical evaluation. *J. Ethnopharmacol.* 58: 189-206, 1997.
- Duncan AC, Jger AK, van Stan J. Screening of Zulu

- medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) Inhibitors. *J. Ethnopharmacol.* 68: 63-70, 1999.
10. Hansen K, Nymann U, Smitt UW, Adersen A, Gudiksen L, Rajasekharan S, Pushpangadan P. In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacol.* 48: 43-51, 1995.
 11. 안덕균. 한국 본초도감, 교학사, p.19, 1998.
 12. 배기환. 한국의 약용식물, 교학사, p.514, 1999.
 13. 최옥자. 약초의 성분과 이용, 과학·백과사전 출판사 엮음, 일월서각, pp.634-635, 1994.
 14. Lee YM, Kang DG, Kim MK, Choi DH, Lee HS. Isolation of Antioxidants from the Seeds of *Xanthium strumarium*. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology* 18(3): 792-796, 2004.
 15. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension* 7(2): 244-252, 1985.
 16. Choi GP, Chung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH, Kim JD. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 10(5): 399-402, 2002.
 17. Oh H, Kang DG, Kwon TO, Jang KK, Chai KY, Yun YG, Chung HT, Lee HS. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. *Phytother Res.* 17(7): 811-813, 2003.
 18. Kang DG, Oh H, Chung HT, Lee HS. Inhibition of angiotensin converting enzyme by lithospermic acid B isolated from *Radix Salviae miltiorrhiza* Bunge. *Phytother Res.* 17(8): 917-920, 2003.
 19. Oh H, Kang DG, Lee S, Lee Y, Lee HS. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. *Planta Med.* 69(6): 564-565, 2003.
 20. Kang DG, Kim YC, Sohn EJ, Lee YM, Lee AS, Yin MH, Lee HS. Hypotensive effect of butein via the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Biol Pharm Bull.* 26(9): 1345-1347, 2003.
 21. Kang DG, Sohn EJ, Kwon EK, Han JH, Oh H, Lee HS. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels. *Vascul Pharmacol.* 39(6): 281-286, 2002.
 22. Oh H, Kang DG, Kwon JW, Kwon TO, Lee SY, Lee DB, Lee HS. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol Pharm Bull.* 27(12): 2035-2037, 2004.
 23. Kang DG, Lee YS, Kim HJ, Lee YM, Lee HS. Angiotensin converting enzyme inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *J Ethnopharmacol.* 89(1): 151-154, 2003.
 24. Ueno H, Horie S, Nishi Y, Shogawa H, Kawasaki M, Suzuki S, Hayashi T, Arisawa M, Shimizu M, Yoshizaki M, Mirita N : Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin; an angiotensin-converting enzyme inhibitor from 'Parapai mi', *Phyllanthanthus niruri*. *J Natl Prod.* 51: 357-59, 1988.
 25. Wagner H, Elbl G.. ACE-inhibitory procyanidins from *Lespedeza capitata*. *Planta Med.*, 58(3): 297, 1992.
 26. Wagner H, Elbl G., Lotter H, Guinea M. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Pharmaceutical Pharmacol. Lett.* 1: 15-18, 1991.
 27. 조영재, 안봉천, 최청. 한국산 녹차로부터 分離한 Flavan-3-ol 化合物의 angiotensin converting enzyme 阻害. *韓國食品科學會誌* 25(3): 238-242, 1993.
 28. Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y, Okuda T, Hatano T. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimon on angiotensin-converting enzyme activity. *J Natl Prod.* 50(4): 680-683, 1987.
 29. Chen CH, Lin JY. Inhibition of angiotensin-I-converting enzyme by tetrahydroxyxanthones isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. *J Natl Prod.* 55(5): 691-695, 1992.
 30. Morota T, Sasaki H, Chin M, Sato T, Katayama N, Fukuyama K, Mitsuhashi H. Studies on the crude drug containing the angiotensin-converting enzyme inhibitors I on the active principles of *Lycium chinense* Muller. *Shoyakugaku Zassi.* 41: 169-173, 1987.
 31. Morigiwa A., Kitabatake K, Fujimoto Y and Ikekawa N. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Gabodermia lucidum*. *Chem Pharm Bull.* 34(7): 3025-3028, 1986.
 32. Ying-Tsun Ma, Mu-Chi Huang, Feng-Lin Hsu, Hsiu-Fong Chang. Thiazinedione from *Xanthium Strumarium*. *Phytochemistry.* 46(6): 1083-1085, 1998.