

동백나무 잎 용매분획물의 항산화 및 항암 활성

김진희 · 정창호 · 심기환[†]

경상대학교 대학원 응용생명과학부 및 농업생명과학연구원

Antioxidative and Anticancer Activities of Various Solvent Fractions from the Leaf of *Camellia japonica* L.

Jin-Hee Kim, Chang-Ho Jeong, Ki-Hwan Shim[†]

Division of Applied Life Sciences, Graduate School, and Institute of Agricultural & Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

To obtain basic information on the potential use of *Camellia japonica* leaf as a raw material in functional food, leaf antioxidant and anticancer activities were investigated. The radical-scavenging activity of various solvent fractions from the leaf, as shown by the DPPH radical test, increased in a dose-dependent manner, with the water fraction showing the highest activity. The reducing power of various solvent fractions from the leaf was also dose-dependent, and, again, the water fraction showed the highest reducing power. The water fraction showed strong antioxidant activity in the linoleic acid test and was also capable of scavenging nitrite in a dose-dependent manner. Proportions of 92.15% and 95.61% of available nitrite were scavenged by the water and butanol fractions, respectively, at levels of 1,000 µg/mL. Both butanol and water fractions exhibited strong inhibitory effects on the growth of human lung and colon cancer cells. The total phenolic contents of the butanol and water fractions were 216.26 mg/g and 220.68 mg/g, respectively. High-performance liquid chromatography (HPLC) showed that quercetin and epicatechin were the predominant phenolic compounds in the water fraction. The activities of this fraction are attributable to the presence of these phenolic compounds, particularly quercetin and epicatechin.

Key words : *Camellia japonica* leaf, antioxidant, anticancer activity

서 론

현대인은 산소에 의한 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있으며, 산업화 이후 계속 증가한 각종 환경오염물질, 흡연, 알콜 및 방사선 등은 인체에 산화적 스트레스를 가중시키고 있다.

Superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxy, alkoxy, hydroperoxy radical 등과 같은 활성산소종 (Reactive oxygen species)은 호기성 생물체의 생명 유지에 절대적으로 필요한 산소가 전자수용체로써 에너지 공급을 위해 생화적 반응이 지속적으로 일어나는 과정에서 발생한

다. 이러한 활성산소들은 효소 불활성화, 지질산화, DNA변성, 세포노화 등을 초래함으로써 암을 비롯한 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 자가 면역질환 등의 심각한 생리적 장애를 일으키는 원인으로 지목되고 있다(1-3). 생물학적 반응으로 생성된 free radical을 제거시켜 생체를 보호하는 생리적 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione S-transferase (GTS) 등이 있으며, 대표적인 천연 항산화제로는 ascorbic acid, β-carotene, flavonoids, tocopherol 및 tannin 등이 알려져 있다(4). 건강에 대한 관심이 높아지면서 최근 웰빙과 함께 천연으로부터 항산화 및 각종 생리활성 성분을 찾고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있으며, 항산화 효과가 풍부한 식품을 일상적으로 섭취함으로써 이들 식품 구성성분의 생체조직기능에 대한 효과를 병행하는 방법 등이 다양하게 검토되고 있다(5-8).

[†]Corresponding author. E-mail : khshim@gnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5479, Fax : 82-55-753-4630

동백나무(*Camellia japonica*)는 동백나무과(Theaceae), 동백속(Camelliae)에 속하는 활엽상록수로 교목성이며, 주로 남해안 도서지역과 서쪽으로는 대청도와 동쪽으로는 울릉도까지 분포하며, 특히 전남지역이 전국 식재 면적의 67%를 차지하고 있다. 예로부터 동백나무는 주로 원예자원으로 이용되어 왔고, 동백종실은 식용유와 화장품, 줄기는 고급 솟의 원료로 활용하여 왔으며, 잎은 차나무가 없는 지역에서 차의 재료로 이용되어 왔다고 알려져 있다(9). 약리학적 효과로 동백나무 잎은 건선(乾癬), 인후통증(咽喉痛症), 화상(火傷)에 효능이 있고, 가지와 열매는 머리비듬, 보혈(補血), 비출혈(鼻出血), 어혈(瘀血), 연골증(軟骨症), 월경이상(月經異常), 이뇨(利尿), 인후통증(咽喉痛症), 장출혈(腸出血), 중독(腫毒), 출혈(出血), 타박상(打撲傷), 토혈(吐血)과 각혈(咯血), 행혈(行血), 화상(火傷) 등에 사용되어져 왔다고 알려져 있다(10).

지금까지 동백나무에 대한 연구로는 잎과 꽃으로 만든 염차와 화차의 주요성분(9), 잎과 꽃 추출물의 항미생물 활성 및 항산화 효과(11), 잎 추출물의 항균효과(12), 혈전용해 효소 활성(13), 혈액 암세포성장 억제 효과(14), 잎 열수 추출 조건 확립(15) 및 꽃과 잎에 함유되어 있는 페놀릭 화합물(16,17)에 대한 연구가 수행되었다. 그 외에도 말린 꽃의 항원충작용 및 진경작용(18), 알코올 흡수억제(19) 및 HIV protease 억제효과(20) 등도 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 동백나무 잎 용매 분획물을 이용한 항산화 및 항암 활성을 조사하여 국내 자생 자원식물의 보존 및 활용 가치를 증진함과 아울러 국민들의 건강에 대한 관심이 날로 증가함에 따른 건강 지향적인 식품 개발이 절실히 요구되고 있는 실정에 따라 우리 기호에 맞는 고부가가치성 가공식품을 개발하기 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 동백나무 잎은 경남 통영시 산양읍 일대에서 자생하는 것을 2008년 4월 초에 채취한 것으로 추출물의 조제는 음건, 세절한 분말시료에 ethanol을 시료 대비 1 : 10(w/v)의 비율로 혼합하여 환류냉각하면서 3회 반복하여 추출하였다. 이 추출액을 No. 2 여과지(Whatman International Limited, Kent, England)로 여과하여 매회 여과한 여액을 혼합하고 rotary vacuum evaporator (N-N series, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 45°C에서 농축하여 클로로포름, 부탄올 및 물의 용매를 이용하여 용매분획 한 후 농축하여 냉장고에 보관하면서 각 실험에 사용하였다. 항산화 및 항암실험에 사용한 시약인 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride,

linoleic acid는 Sigma사(St Louis, MO, USA), fetal bovine serum, RPMI 1640, 0.25% trypsin-EDTA는 GIBCO사(Grand Island, N.Y., USA) 제품을 사용하였으며, 그 외 시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

여러 농도의 시료 1 mL에 에탄올로서 1.5×10^{-4} M 농도가 되게 한 DPPH (1,1-diphenyl- 2-picryl-hydrazyl)용액 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다(21).

환원력

여러 농도의 시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 UV-spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(22).

Linoleic acid system을 이용한 항산화 활성

Cap test tube에 시료(1 mL), linoleic acid(0.13 mL), 99.8% ethanol 용액(10 mL) 및 0.2 M phosphate buffer 용액(pH 7.0, 10 mL)을 첨가한 뒤 증류수를 이용하여 총 부피 25 mL가 되도록 조정하여 반응용액으로 사용하였다. 각 반응용액은 40°C에서 incubation 시킨 뒤 0.2 mL를 취하여 75% ethanol 용액(9.4 mL), 30% ammonium thiocyanate 용액(0.2 mL) 20 mM ferrous chloride-3.5% HCl 용액(0.2 mL)을 가하고 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

아질산염 소거 활성

아질산염 소거 활성측정은 Kato 등의 방법(24)에 따라 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 시료를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2, 4.0 및 6.0으로 조절하여 반응용액의 최종 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL, Griess(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1 : 1 비율로 혼합한 것, 사용직전 조제) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 UV-spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 량을 산출하였다. 이때 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 같은 방법으로 실험하

였으며, 아질산염 소거 활성은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 백분율(%)로 나타내었다.

암세포 성장 억제효과

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 폐암세포주인 A549와 결장암세포주인 SW480으로 한국세포주은행으로부터 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 RPMI 1640배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종 세포농도가 5×10⁴ cells/mL가 되도록 희석하여 48 well plate에 각 well당 450 µL씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 시료를 첨가하고 48시간 배양한 후 세포증식 정도를 SRB방법에 의하여 측정하였다(25).

총 flavonoid 및 phenolic 화합물 함량 분석

총 flavonoid 화합물 분석은 시료 1 mL에 디에틸렌글라이콜(diethylene glycol) 10 mL, 1 N 수산화나트륨 1 mL를 넣고 진탕한 후 37°C에서 1시간 방치하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 나린진으로 작성한 검량곡선에 준하여 함량을 환산하였다(26). 총 phenolic 화합물을 분석하기 위하여 시료 0.1 mL에 증류수 3 mL, 0.016 M 포타슘 페리시아나이드(K₃Fe(CN)₆) 1 mL, 0.01 M 삼염화철(FeCl₃/0.1N HCl) 용액 1 mL를 넣고 혼합한 후 15분간 방치하고, 안정제(H₂O : 1% gum arabic : 85% phosphoric acid = 3 : 1 : 1, v/v/v) 5 mL 첨가한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 몰식자산(gallic acid)으로 작성한 검량곡선으로 함량을 환산하였다(27).

Flavonol 화합물 및 catechin류 화합물 분석

동백나무 잎의 물 분획물에 함유되어 있는 flavonol 화합물(myricetin, quercetin 및 kaempferol)을 분석하기 위하여 분획물 1 g에 60% ethanol(40 mL)과 6 M HCl 5 mL를 첨가한 후 95°C 수욕상에서 2시간 동안 환류냉각시킨다. 이 추출물을 50 mL volumetric flask를 이용하여 60% ethanol로 volume을 50 mL가 되게 정용한 다음 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC(1100 series, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다(28). Catechin류 화합물을 분석하기 위하여 물 분획물 1 mg에 시액 {0.2 M 인산완충액 (pH 3.0) : 메탄올 : 물 = 2 : 3 : 15, v/v/v} 1 mL로 용해하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 다음 HPLC로 측정하였다. 분석조건은 HPLC(1100 series, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), column은 HP Hypersil ODS(200 × 4.6 mm, 40°C), 이동상은 acetonitrile : acetic acid : methanol : water (113 : 5 : 20 : 862, v/v/v/v), 검출기는 photodiodearray detector(1100 series, Agilent Technologies

Inc., Santa Clara, CA, USA), UV detection at 280 nm, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20 µL로 하였다(29).

통계처리

통계처리는 Window 용 SAS 8.0 version을 이용하여 분산분석(analysis of variance)을 실시하였으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거 활성

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한 방법이다. 이 물질은 radical을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 ethanol 용액에서는 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성 물질이 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있고, 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있는 방법이다. 전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다(30). 동백나무 에탄올 추출물을 3종류 용매 즉, 클로로포름, 부탄올 및 물로 용매 분획한 후 얻은 용매분획물을 이용하여 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 동백나무 잎 용매분획물의 농도가 증가하면서 DPPH radical소거활성 또한 증가하는 농도의존적인 경향을 보였으며, 특히 부탄올과 물 분획물에서 가장 높은 소거활성을 보여 62.5 µg/mL의 농도에서 각각 93.04 및 94.14%의 소거활성을 나타내어 positive control로 사용한 ascorbic acid와 유사한 활성을 보였다. Lee

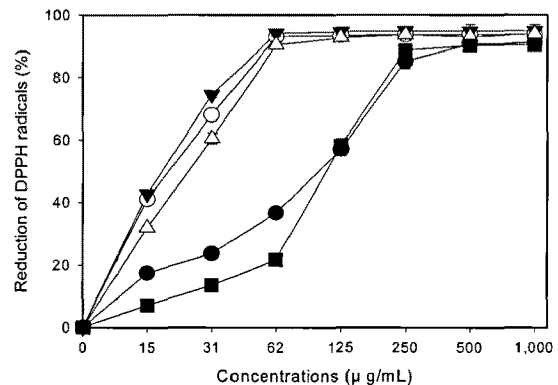


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activities of various solvent fractions from ethanol extract of *Camellia japonica* L. leaf.
 ● : Chloroform fr., ○ : Butanol fr., ▼ : Water fr., △ : Ascorbic acid, ■ : α-tocopherol

등(11)은 동백나무의 각 부위별 추출물들은 최고농도 100 µg/mL에서 어린잎은 92.19%, 성숙한 잎은 89.22%, 꽃봉오리는 93.54%, 꽃은 93%, 수피는 88.18%, 가지는 76.26%, 종자도 76.26%로 동백나무의 항산화 효과가 70~90%이상으로 동일농도에서 합성산화제인 Vit C, Vit E 및 BHT와 유사한 free radical 소거능을 보였다라고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보였다.

환원력

동백나무 잎의 용매 분획물의 농도를 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타났다. 환원력도 DPPH radical 소거활성과 마찬가지로 3종류의 용매 분획물을 이용하여 환원력을 측정한 결과 용매 분획물의 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 나타내었으며, 물 분획물에서 가장 높은 환원력을 나타내었으며, 부탄올 및 클로로포름 분획물 순으로 나타났다. 클로로포름, 부탄올 및 물 분획물 농도 1,000 µg/mL에서 각각 0.59, 1.46 및 2.07의 환원력을 보여 높은 항산화 활성능력을 보여 주었으나 positive control로 사용한 ascorbic acid와 α-tocopherol 보다는 낮은 환원력을 보였다. Jeong 등(31)은 도라지 지상부 용매분획물을 이용하여 환원력을 측정한 결과 폴리페놀 성분이 가장 많이 함유되어 있는 부탄올 분획물에서 가장 높은 환원력을 보였으나, 1.25 mg/mL의 농도에서 1.03으로 positive control로 사용한 ascorbic acid(7.84)와 α-tocopherol(7.84) 보다는 낮은 환원력을 보였다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험의 재료인 동백나무 잎 용매 분획물도 각종 polyphenol 화합물들이 많이 함유되어 있기 때문에 높은 환원력을 나타내었을 것으로 생각되며, 환원력과 라디칼 소거능의 경향은 매우 깊은 관련이 있고, 이는

항산화물질의 작용이 여러 기작, 즉, 연쇄반응 개시의 방해, 전이 금속물의 결합, 과산화물의 분해, 연속적인 수소제거의 방해, 라디칼 소거능과 매우 깊은 관련이 있기 때문이다(32).

Linoleic acid system을 이용한 항산화 활성

과산화지질은 생체 내에서 각종 효소나 지단백질을 변성시키고, 세포막을 파괴하여 급성 조직장애 및 세포노화를 유도하며, 혈소판 응집, 간 질환, 당뇨병, 고지혈증 등 각종 성인병의 원인이 될 뿐만 아니라 발암의 원인으로 주목받고 있다. 그러므로 식품이나 생체 막에 존재하는 지질의 산화를 방지하기 위하여 흔히 항산화제를 이용하게 되는데 항산화제의 종류는 다양하며, 이러한 항산화제의 활성을 평가하는 방법에는 주로 linoleic acid와 같은 지방산을 반응기질로 이용하여 과산화지질을 정량하는 방법이 주로 이용되고 있다(33). 따라서 식품이나 생체 막에 존재하는 지질의 산화를 방지하기 위하여 동백나무 잎 용매 분획물을 이용하여 과산화 지질 생성억제활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료를 첨가하지 않은 control의 경우 저장기간이 경과함에 따라 지질의 산화가 진행되어 흡광도가 급격하게 증가된 반면 동백나무 잎 부탄올과 물 분획물을 첨가한 시료에서는 대조구와 비교하여 과산화 지질의 생성이 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히 물 분획물의 경우에는 positive control로 사용한 α-tocopherol과 유사하게 저장 72시간 까지 초기의 흡광도수치와 비교하여 큰 변화를 보이지 않아 지질의 산화를 억제하는 효과가 매우 높았다. Kang 등(34)은 민들레 부위와 농도에 따른 물추출물의 과산화물 생성억제율을 측정한 결과 민들레 물추출물은 부위에 관계없이 첨가농도가 증가할수록 과산화물의 생성이 유의적으로 억제되는 경향이었으며, 잎의 물추출물은 추출물 농도 0.2 mg/mL 미만에서는 60% 이하의 낮은 항산화 활성을 나타내었고, 농도 0.2에서 1.0 mg/mL로 농도가 증가할수록 83.01, 86.05, 87.42 및 89.96%로 높은 항산화성을 나타내었다고 보고하

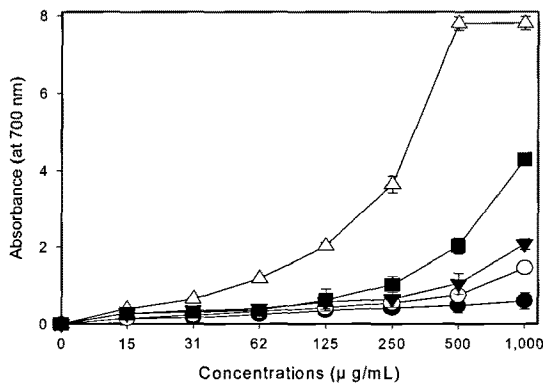


Fig. 2. Reducing power of various solvent fractions from ethanol extract of *Camellia japonica* L. leaf.

● : Chloroform fr., ○ : Butanol fr., ▼ : Water fr., △ : Ascorbic acid, ■ : α-tocopherol

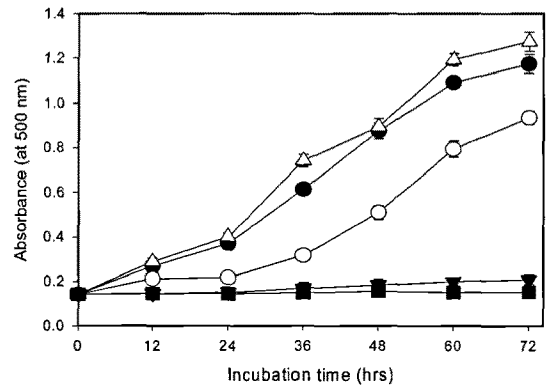


Fig. 3. Antioxidative activities of various solvent fractions from ethanol extract of *Camellia japonica* L. leaf on linoleic acid at 1 mg/mL.

● : Chloroform fr., ○ : Butanol fr., ▼ : Water fr., △ : Control, ■ : α-tocopherol.

여 본 실험에서 동백나무 잎의 물 분획물에서도 민들레 잎의 물추출물과 동일하게 과산화지질의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

아질산염 소거 활성

식품의 가공 및 저장, 특히 수산물이나 식육제품에 첨가하여 독소생성억제와 발색, 산패방지제로 널리 이용되고 있는 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내어 일정농도이상 섭취하게 되면 혈액중의 헤모글로빈이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증 등 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 단백질 식품, 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 제 2급 및 3급 아민 등의 아민류와 아질산염이 반응하여 발암성 물질인 nitrosamine을 생성하는 것으로 보고되어 있다(35). 3종류의 동백나무 용매분획물을 이용하여 아질산염 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 4에서 보시는 바와 같이 부탄올 및 물 분획물에서 높은 아질산염 소거활성을 보였으며, 분획물의 농도가 증가함에 따라 농도의 존적으로 아질산염 소거활성이 나타났고, 특히 물 분획물의 경우 농도 125 µg/mL에서 94%의 매우 높은 아질산염 소거활성을 보였다. 니트로소화 반응을 억제하기 위해서는 니트로소아민 생성기질 물질인 아민의 생성을 억제하거나 아질산염을 소거하는 방법 중 일반적으로 아질산염 소거에는 ascorbic acid, α-tocopherol, 아황산 가스, 페놀성 화합물 등이 이용되며(24), Park 등(36)의 보고에서와 같이 각종 페놀성 화합물이 산성조건에서 아민 보다도 더 경쟁적으로 아질산염과 반응하여 산화 질소 혹은 질소와 같은 해가 없는 산물로 전환하여, 니트로소화 반응을 강력하게 억제하는 것으로 보고하여 동백나무 잎 부탄올 및 물 추출물에서도 이와 같은 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있기 때문에 위와 같은 결과를 나타내었을 것으로 생각된다.

인체 암세포주에 대한 in vitro 세포 독성

암은 전 세계적으로 가장 널리 퍼져있는 질병으로 해마

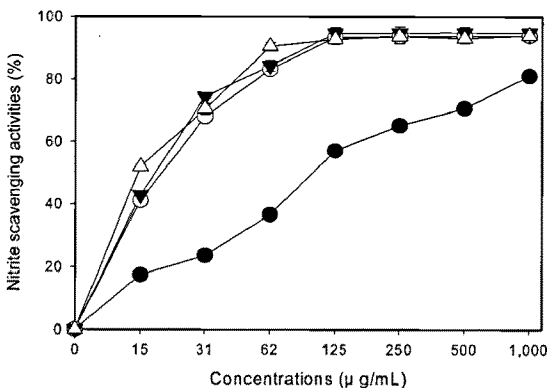
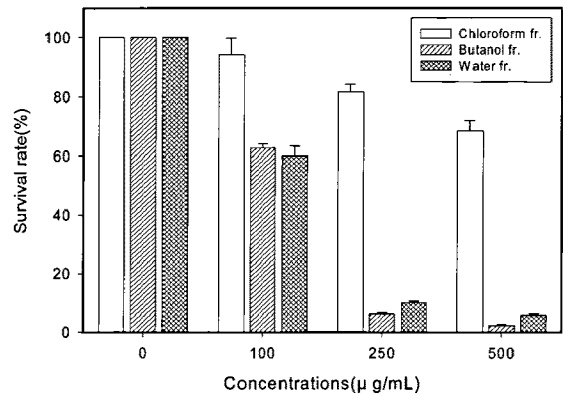


Fig. 4. Nitrite scavenging effects of various solvent fractions from ethanol extract of *Camellia japonica* L. leaf.

● : Chloroform fr., ○ : Butanol fr., ▼ : Water fr., △ : Ascorbic acid.

다 많은 인구가 사망하고 있으며, 우리나라의 경우 암으로 인한 사망률이 전체 사망률 중 높은 수치를 나타내고 있고, 발생률도 증가하고 있다. 현재 항암제는 조기암을 비롯한 암치료의 전과정에 대부분 투여되고 있으며, 이는 항암제가 전신적으로 작용하기 때문에 치료 및 전이를 예방하기 위하여 선호되고 있다고 볼 수 있다. 그러나 항암제가 암세포에 대한 항암효과 이외 정상세포에 대해서도 강한 독성과 약제내성과 같은 부작용을 나타내고 있기 때문에 부작용이 적은 천연물질을 대상으로 개발 연구에 노력하고 있다(37). 동백나무 잎 용매분획물을 이용하여 폐암세포주인 A549와 결장암 세포인 SW480 cell을 이용하여 항암활성을 측정한 결과 용매 분획물의 농도가 증가함에 따라 암세포의 성장을 또한 낮아짐을 알 수 있었고, 클로로포름 분획물에 비하여 폴리페놀 화합물의 함량이 높은 부탄올과 물 분획물에서 높은 항암활성을 나타내었다. 특히 동백나무 잎의 부탄올 및 물 분획물 농도 500 µg/mL의 농도에서 폐암세포주에 대하여 각각 2.27 및 6.72%의 생존율을 나타내어 폐암세포주에 대한 생육억제효과가 매우 높게 나타났다 (Fig. 5).

A



B

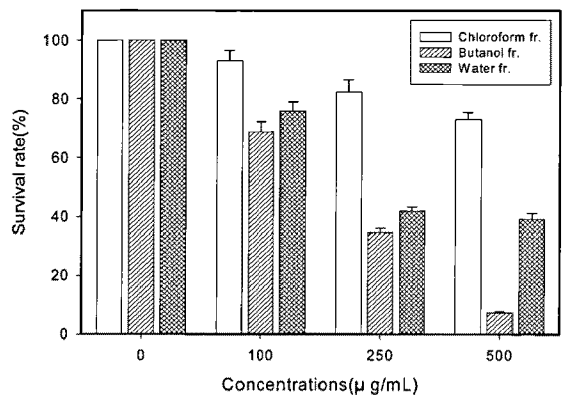


Fig. 5. Cytotoxicities of various solvent fractions from ethanol extract of *Camellia japonica* L. leaf on human lung(A) and colon(B) cancer cell line.

Hwang 등(38)은 동백의 어린잎은 폐암세포(IC₅₀ 79 µg/mL)와 위암세포(IC₅₀ 39 µg/mL)에 대해 상당히 강한 세포독성을 나타냈는데, 특히 위암세포에 대해서는 IC₅₀ 39 µg/mL에서 높은 치사효과를 보였고, 또한 성엽과 비교해 볼 때, 동일한 암세포주에 대해 어린잎이 성엽보다 훨씬 높은 저해효과를 가지고 있음을 알 수 있으며, 항암효과가 있는 주요 성분의 함량이 성엽보다는 어린잎에 더 많을 것으로 생각되어 기능성 차의 재료로서 성엽보다는 어린잎이 더욱 유용할 것이라고 보고하였다.

총 phenolics 및 개별 polyphenol 화합물 함량

식물체내의 페놀화합물은 2차 대사산물로서 항산화, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내며, 특히 항산화 활성은 페놀성 화합물이 작용하는 것으로 보고되고 있고, 이와 같이 페놀 화합물 함량과 항산화 활성간의 상호작용에 대한 많은 연구들에서 알 수 있듯이 식물체가 지니고 있는 페놀 화합물의 함량을 조사함으로써 식물유래 천연추출물의 항산화 활성을 탐색하는 일차적인 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다(39). 동백나무 잎 용매분획물의 총 flavonoid 및 총 phenolic 화합물의 함량과 항산화 활성 및 항암활성이 높게 나타난 물 분획물의 개별 polyphenol 화합물의 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 총 flavonoids 함량은 클로로포름, 부탄올 및 물 분획물에서 각각 25.43, 123.47 및 117.18 mg/g이었고, 총 phenolic 화합물의 함량은 62.37, 216.26 및 220.68 mg/g으로 나타났다. 물 분획물의 개별 polyphenol

화합물은 총 6종이 분리, 동정되었으며, 그 중 flavonol에서는 quercetin의 함량이 62.17 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 보였고, polyphenol류에서는 epicatechin이 35.55 mg/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었다. 여러 연구결과에 의하면 수산기, 카르복실기 및 메톡시기가 결합된 페놀화합물과 플라보노이드는 항산화 뿐만 아니라 암세포주에 대한 성장억제효과가 매우 높은 것으로 보고되고 있다(40-42). 따라서 동백나무 잎 물 분획물에서 나타난 항산화 및 항암 활성은 quercetin 등과 같은 페놀릭 화합물에 의한 것으로 생각되며, 위의 결과를 종합하여 볼 때 동백나무 잎은 천연 항산화제 및 기능성 식품재료로 활용가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

요 약

동백나무 잎을 새로운 기능성 식품의 재료로 활용하기 위하여 항산화 및 항암활성을 측정된 결과는 다음과 같다. DPPH radical 소거활성을 측정된 결과 분획물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 물 분획물에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 보였다. 환원력도 분획물의 농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 환원력 또한 물 분획물에서 가장 높게 나타났다. Linoleic acid를 이용한 자동산화 억제활성을 실험한 결과 다른 분획물에 비하여 물 분획물에서 가장 높은 과산화 억제활성을 나타내었고, 분획물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거활성 역시 증가하는 경향을 보였으며, 특히 부탄올 및 물 분획물을 1,000 µg/mL의 농도로 첨가하였을 때 각각 92.15%와 95.61%의 높은 아질산염 소거활성을 보였다. 폐암세포와 결장암세포에 대한 생육억제활성을 측정된 결과 부탄올 및 물 분획물에서 가장 높은 생육억제활성을 보였다. 총 페놀릭 화합물은 부탄올 및 물 분획물에서 각각 216.26 및 220.68 mg/g으로 나타났으며, HPLC로 물 분획물의 페놀릭 화합물을 분석한 결과 quercetin과 epicatechin이 가장 많이 함유되어 있었고, 동백나무 잎의 항산화 및 항암활성은 quercetin과 epicatechin과 같은 폴리페놀 화합물에 의한 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Wiseman, H. (1996) Important in protection against oxidative damage and disease. *Nutr. Biochem.*, 7, 2-6
2. Wickens, A.P. (2001) Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.*, 128, 379-391
3. Block, G. (1993) Vitamin C, cancer and aging. *Age*, 16, 55-58

Table 1. Total flavonoids, total phenolics, flavonols and polyphenols content of *Camellia japonica* leaf.

		Content
Total flavonoids (mg/g)	Chloroform fr.	25.43±1.28 ^a
	Butanol fr.	123.47±3.74
	Water fr.	117.18±2.73
Total phenolics (mg/g)	Chloroform fr.	62.37±2.19
	Butanol fr.	216.26±4.24
	Water fr.	220.68±2.62
Flavonols (mg/100 g)	Myricetin	12.82±4.28
	Quercetin	62.17±3.13
	Kaempferol	52.54±2.37
	Gallic acid	3.86±0.31
Polyphenols (mg/100 g)	Epicatechin gallate	- ^b
	Catechin	16.93±1.07
	Epicatechin	35.55±2.54
	Epigallocatechin gallate	-
	Epigallocatechin	-

^aValues indicate the mean's of three replications (n=3).

^bNot detected.

4. Borrello, S., Seccia, A., Galleott, T., Bartoli, G.M., Farallo, E. and Serri, F. (1984) Protective enzyme in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.*, 276, 338-340
5. Cha, B.C. and Lee, E.H. (2007) Antioxidant activities of flavonoids from the leaf of *Smilax china* Linne. *Korean J. Pharmacogn.*, 38, 31-36
6. Lee, Y.M., Shin, H.D., Lee, J.J. and Lee, M.Y. (2007) Antioxidative effect of *Chaenomelis frutus* ethanol extract. *Korean J. Food Preserv.*, 14, 177-182
7. Park, Y., Boo, H.O., Park, Y.L., Cho, D.H. and Lee, H.H. (2007) Antioxidant activity of *Momordica charantia* L. extracts. *Korean J. Med. Crop. Sci.*, 15, 56-61
8. Zin, Z.M., Hamid, A.A., Osman, A., and Saari, N. (2006) Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chem.*, 94, 169-178
9. Cha, Y.J., Lee, J.W., Kim, J.H., Park, M.H. and Lee, S.Y. (2004) Major components of teas manufactured with leaf and flower of Korean native *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop Sci.*, 12, 183-190
10. Lee, S.H. and Kim, S.K. (1992) Natural distribution and characteristics of populations of *Camellia japonica* in Korea. *J. Korean Soc. Hort. Sci.*, 33, 196-208
11. Lee, S.Y., Hwang, E.J., Kim, G.H., Choi, Y.B., Lim, C.Y. and Kim, S.M. (2005) Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop Sci.*, 13, 93-100
12. Han, Y.S. (2005) Antimicrobial effects of *Camellia japonica* L. leaves extract on food-orne pathogenic microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 37, 113-121
13. Lim, C.Y., Lee, S.Y., Pyo, B.S. and Kim, S.M. (2006) Fibrinolytic enzyme activity of extract from *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop Sci.*, 14, 195-201
14. Kim, J.H., Lee, S.Y. and Cho, S.I. (2003) Anti-proliferative effect of *Camellia japonica* leaves on human leukemia cell line. *Korean J. Herbology*, 18, 93-98
15. Chung, J.H., Lee, H.J., Lee, S.Y., Kim, K.S., Rim, Y.S., Shin, S.C., Jung, K.H., Park, K.H. and Moon, J.H. (2006) Establishment of conditions for hot water extraction of *Camellia japonica* leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 38, 823-828
16. Cho, J.Y., Ryu, H.J., Ji, S.H., Moon, J.H., Jung, K.H. and Park, K.H. (2009) Phenolic compounds from the flower buds of *Camellia japonica*. *Food Sci. Biotechnol.*, 18, 766-770
17. Cho, J.Y., Ji, S.H., Moon, J.H., Lee, K.H., Jung, K.H. and Park, K.H. (2008) A novel benzoyl glucoside and phenolic compounds from the leaves of *Camellia japonica*. *Food Sci. Biotechnol.*, 17, 1060-1065
18. Bhakuni, D.S., Goel, A.K., Jain, S., Mehrotra, B.N., Patnaik, G.K. and Prakash, V. (1988) Screening of Indian plants for biological activity part (XIII). *Indian J. Exp. Biol.*, 26, 883-904
19. Yoshikawa, M., Harada, E., Murakami, T., Matsuda, H., Yamahara, J. and Murakami, N. (1994) *Camellia* saponins B1, B2, C1 and C2, new type inhibitors of ethanol absorption in rats from the seeds of *Camellia japonica* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 742-749
20. Park, J.C., Hur, J.M., Park, J.G., Hatano, T., Yoshida, T., Miyashiro, H., Min, B.S. and Hattori, M. (2002) Inhibitory effects of Korean medicinal plants and camelliatanin H from *Camellia japonica* on human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phyther. Res.*, 16, 422-426
21. Blois, M.A. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-200
22. Yen, G.H. and Chen, H.Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 27-32
23. Lee, J.Y., Hwang, W.I. and Lim, S.T. (2004) Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 409-415
24. Kato, H., Lee, I.E., Chyen, N., Kim, S.B. and Hayase, F. (1987) Inhibitory of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1333-1338
25. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahan, L., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1990) New colorimetric assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107-1112
26. Graham, H.D. (1992) Modified prussian blue assay for total phenolic compound. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 801-805
27. Jeong, C.H., Choi, S.G. and Heo, H.J. (2008) Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasa borealis* leaf tea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40, 586-592
28. Huaifu, W. and Keith, H. (2001) Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography.

- Food Res. Int., 34, 223-227
29. Bae, S.K., Lee, Y.C. and Kim, H.W. (2001) The browning reaction and inhibition of apple concentrated juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 6-13
 30. Choi, J.H. and Oh, S.K. (1995) Studies on the anti-aging of Korean ginseng. Korean J. Food Sci. Technol., 17, 506-515
 31. Jeong, C.H., Choi, G.N., Kim, J.H., Kwak, J.H., Kim, D.O., Kim, Y.J. and Heo, H.J. (2010) Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. Food Chem., 118, 278-282
 32. Yoshino, M. and Murakami, K. (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds, application to antioxidant characterization. Anal. Biochem., 257, 40-44
 33. Lee, K.A. and Chung, H.Y. (2004) Biological activities of a Korean traditional prescription Nogyongdaebotang. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 33, 28-33
 34. Kang, M.J., Shin, S.R. and Kim, K.S. (2002) Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion(*Taraxacum officinale*). Korean J. Food Preserv., 9, 253-259
 35. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D. (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds(in Korean). Korean J. Food Sci. Technol., 28, 232-239
 36. Park, Y.B., Lee, T.G., Kim, W.K., Do, J.R., Yeo, S.G., Park, Y.H. and Kim, S.B. (1995) Characteristics of nitrite scavenger derived from seeds of *Cassia tora* L. Korea J. Food Sci. Technol., 27, 124-128
 37. Min, K.J., Cheon, J.U. and Cha, C.G. (2008) Anti-oxidative and anti-cancer activities of extraction of yacon. J. Food Hyg. Safety, 23, 163-168
 38. Hwang, E.J., Cha, Y.J., Park, M.H., Lee, J.W. and Lee, S.Y. (2004) Cytotoxicity and chemosensitizing effect of *Camellia*(*Camellia japonica*) tea extracts. J. Korean Soc Food Sci Nutr., 33, 487-493
 39. Boo, H.O., Lee, H.H., Lee, J.W., Hwang, S.J. and Park, S.U. (2009) Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. Korean J. Med. Crop Sci., 17, 15-20
 40. Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh B.N. (2007) Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. Int. J. Food Sci. Nutr., 58, 18-28
 41. Jung, H.A., Jung, M.J., Kim, J.Y., Chung, H.Y. and Choi, J.S. (2003) Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. Arch. Pharm. Res., 26, 809-815
 42. Marzouk, M.S., Soliman, F.M., Shehata, I.A., Rabee, M. and Fawzy, G.A. (2007) Flavonoids and biological activities of *Jussiaea repens*. Nat. Prod. Res., 21, 436-443

(접수 2009년 12월 15일, 채택 2010년 4월 2일)