

96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정과 그 응용

최정섭* · 오정임 · 황인택 · 김성은¹ · 전재철¹ · 이병희 · 김진석 · 김태준 · 조광연

한국화학연구원 생물기능연구팀, ¹전북대학교 응용생물공학부

요약 : 96-well plate를 사용해서 DPPH free radical 소거활성의 고효율검정(high throughput screening)방법을 확립하였고, 이 방법을 이용하여 107개의 식물특정 효소저해제와 다양한 식물 추출물의 항산화활성을 조사하였다. DPPH free radical 소거활성 측정 측정을 위한 적정 시험조건은 총 반응액이 250 μ L일 경우 100 μ M의 DPPH(pH 7.8), 20분의 반응시간이었고, 이 조건하에서 ascorbate와 α -tocopherol은 농도 의존적인 항산화활성을 나타내었다. 107개의 식물 특정효소저해제 중에서 11개의 화학물질이 100 μ M 농도에서 70% 이상의 항산화활성이 있었는데, 특히 ampicillin과 gallic acid는 각각 90.2%와 92.6%의 나타났다. 또한 100개의 식물 추출물은 50 μ g/mL 농도에서 70% 이상의 활성을 보이는 추출물이 11개이었는데, 그 중에서 AT-407의 활성이 90.1%로 가장 높게 나타났다. 따라서 96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정방법은 여러 가지 합성물질이나 다양한 천연물질에 대하여 보다 간편하고 신속하게 항산화활성을 측정할 수 있을 것으로 사료되었다.(2003년 1월 10일 접수, 2003년 6월 20일 수리)

Key words : DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical, 96-well plate, antioxidants, plant-specific enzyme inhibitors, plant crude extracts.

서 론

산소를 이용하는 모든 생물체는 정상적인 대사과정에서도 지속적으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데(Oberley 등, 1995), 정상적인 대사과정에서는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase와 같은 항산화효소(Shull 등, 1991)나, ascorbate, α -tocopherol, glutathione과 같은 저분자 항산화제들이 이러한 활성산소종들을 제거시킨다(Ottino 등, 1997; Traber, 1997). 그러나 심한 산화 스트레스(oxidative stress)가 계속되어 활성산소가 식물체내에서 과다하게 생성될 경우 광합성 관련 효소의 활성저하, 색소체의 파괴, 지질 과산화작용을 통한 생체막의 파괴 등 식물체의 주요 대사가 저해되고(Foyer와 Halliwell, 1976; Salin, 1988), 동물의 경우에도 각종 암, Alzheimer's disease(Benzi와 Moretti, 1995), 노화, 심장질환, 염증(Rohrdanz와 Kahl, 1998) 등 여러 가지 질병과 관련이 있다고 알려져 있다.

최근 들어 산화 스트레스 무독화 기작에 대한 관심이 증가되면서 항산화제를 이용한 작물 보호제의 개발이나 항 스트레스성 작물의 육종(Baek 등, 2000) 및 이와 관련된 유전자 연구가 진행되고 있으며(Kwon 등, 2002), 항산화작용을 가진 각종 천연물 및 화학물질을 건강식품 또는 의약품으로 개발하려는 노력(No 등, 1999; 김과 김, 2001; 허 등, 2001)이 증대되고 있다.

그 동안 항산화활성 측정 방법이 다양하게 개발되었는데, 예를 들어 oxygen radical absorbance capacity (ORAC)법이나 low density lipoprotein(LDL)법(Handelman 등, 2001), β -carotene bleaching법(Pastore 등, 2000), electron spin resonance(ESR)법(Ogata 등, 2002) 등이 있다. 그러나 이러한 측정방법은 실험 기기의 사용이 복잡하거나 측정하는 시간과 노력이 상대적으로 많이 요구되는 등의 번거로움이 있다. 한편, DPPH free radical 소거활성 측정법은 1958년에 처음 소개되었는데(Blois, 1958), 색상의 변화정도를 이용하여 항산화활성을 측정하는 아주 간편한 방법으로 지금도 많은 연구자들은 이 방법을 이용하여 항산화활성을

*연락처

측정하고 있다(Abe 등, 1998a; Martin 등, 2000; Abe 등, 2002).

그런데, 최근 들어 조합화학 기술이 발달하면서 단 시간에 다량의 유기화합물을 합성할 수 있게 되었고, 천연물질의 이용에 대한 관심이 높아지면서 다양한 천연물의 확보가 이루어지고 있으며, 특히 유전공학 기법의 급속한 발달로 인하여 많은 대사산물의 확보가 용이하게 되었다. 이와 같이 다양한 종류의 물질로부터 항산화작용을 가진 물질을 탐색하고자 할 경우, 보다 간편하고 신속하게 확인할 수 있는 기술개발이 필요하게 되었다.

따라서, 본 실험은 기존의 DPPH free radical 소거활성 측정방법을 기본으로 하여 보다 간편하고 효율적인 탐색체제(high throughput screening, HTS)를 개발하기 위하여 96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정방법을 실험실 조건에서 확립하고, 이를 식물특정 효소저해제와 다양한 천연물로부터 새로운 항산화물질을 탐색하는데 적용해 보고자 하였다.

재료 및 방법

시험약제

시험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbate 및 α -tocopherol은 Sigma(USA)사로부터 구입하였는데, 지용성 항산화제인 α -tocopherol은 water-soluble type(Trolox)을 사용하였다. 새로운 항산화활성 측정은 식물특정 효소저해제 107개와 식물추출물 100개를 대상으로 수행하였는데, 식물특정 효소저해제들은 문헌조사를 통하여 선정하고 이를 Sigma와 Aldrich chemical(USA)사로부터 구입하였고(황 등, 2001), 식물추출물은 한국천연물은행으로부터 확보하였다. 이들은 알파벳순으로 정리한 HIT-일련번호와 AT-일련번호로 간편하게 하였다.

96-well plate를 이용한 free radical 소거활성 측정방법

에탄올로 용해시킨 DPPH 용액을 247.5 μ L씩 96-well plate에 multi-channel pipette으로 분주하고, 여기에 시료를 2.5 μ L씩 첨가하여 최종 반응용액이 250 μ L가 되도록 하였다. 이를 일정시간 동안 반응시킨 후 micro-plate reader(Bio-Rad)를 사용하여 517nm에서의 흡광도 변화를 측정하였고, 무처리구와 처리구의

값을 비교하여 free radical 소거활성을 결정하였다.

Free radical 소거활성 측정을 위한 적정 반응시간을 파악하기 위하여 DPPH 농도를 100 μ M(pH 7.8)로 고정하고 ascorbate 농도를 10, 30, 50 μ M로 처리하고, 경시적으로 40분까지 반응시키면서 5분 간격으로 흡광도의 변화를 조사하였다. 또한, DPPH 용액의 적정 농도를 조사하기 위해 pH 7.8, 반응시간 20분, ascorbate 농도를 50 μ M로 고정하고 DPPH 농도를 300, 100 및 25 μ M로 처리하였으며, DPPH 100 μ M, 반응시간 20분, ascorbate 농도 50 μ M일 때 용액의 pH를 2, 4, 6, 8 및 10으로 조절하여 적정 pH를 조사하였다.

항산화 물질 탐색

시험조건을 DPPH 100 μ M, pH 7.8, 반응시간 20분으로 고정하고 10, 20, 30, 40 및 50 μ M의 ascorbate와 10, 20, 30, 40, 50 및 100 μ M의 α -tocopherol을 처리하였다. 또한, 107개의 효소저해제들(HIT-series)은 최종 농도가 100 μ M이 되도록 희석 조제하여 처리하였고, 한국천연물은행으로부터 확보한 100개의 메탄을 추출물(AT-series)은 500 μ g/mL로 처리하고 이들 중에서 효과가 우수한 추출물들은 50 μ g/mL로 재처리하여 free radical 소거능력이 우수한 화학물질 및 식물추출물을 선별하였다.

결과 및 고찰

적정 반응시간 및 ascorbate 농도

DPPH 용액 100 μ M, pH 7.8의 조건에서 ascorbate를 첨가한 후 경시적으로 free radical 소거정도를 조사한 결과, 적정 반응시간은 20분 내외였다(그림 1). Ascorbate 30 및 50 μ M농도에서 20분까지는 반응시간의 경과에 따라 free radical 소거활성 정도가 직선적으로 증가하였으나, 그 이후에는 별다른 변화가 없었다. 이러한 결과는 DPPH 용액 중의 free radical이 ascorbate에 의하여 완전 소거되었거나, autooxidation이 일어나기 때문인 것으로 생각되었다. Martin 등(2000)에 의하면 DPPH 용액 내에서 α -tocopherol 첨가 후 반응시간이 경과할수록 free radical 소거활성이 증가한다고 하였다. 실제로 ascorbate나 α -tocopherol은 DPPH 용액과의 반응이 시작됨과 동시에 반응액의 색상변화를 육안으로도 확인할 수 있을 정도로 빠르게 진행되

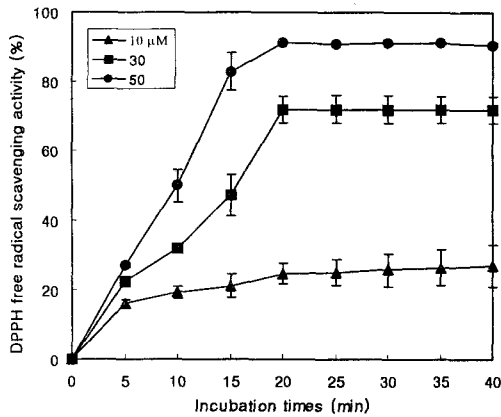


Fig 1. Effect of incubation time on DPPH free radical scavenging activity in 96-well plate. DPPH free radical activity for incubation time was determined at 100 μM DPPH ethanolic solution (pH 7.8) and ascorbate of 10, 30, 50 μM.

었다(결과 미 제시). 그러나 이러한 급속한 반응도 항산화제가 DPPH의 free radical을 소거하는 동안에는 계속해서 이루어지지만, 반응액 내의 free radical이 완전히 소거되면 반응도 정지하는 것으로 사료된다. 따라서, 적정 반응시간은 반응액 중의 DPPH 농도와 검색하고자 하는 항산화제의 농도에 따라 달라질 것으로 생각된다. Martin(2000)과 Abe 등(2000)에 따르면, DPPH 용액과 검색시료의 농도에 따라 반응시간은 1분에서 2시간까지 다양하게 보고하기도 하였다.

한편, ascorbate 10 μM 농도에서는 반응 40분 후에도 free radical의 소거활성이 30% 이하로 낮았으며, 30 μM 농도에서는 반응시간에 따라 직선적으로 소거활성이 증가 하지만 20분 후에도 72%로 나타났다. 그러나 ascorbate 50 μM 농도에서는 free radical의 소거활성이 급격하게 증가하여, 20분 후에는 90% 이상의 높은 소거활성을 나타내었다. 따라서, 본 실험조건에서의 적합한 ascorbate의 농도는 50 μM인 것으로 사료되었다.

적정 DPPH 용액 농도

반응용액의 pH 7.8, 반응시간 20분, ascorbate 농도 50 μM의 시험조건에서 DPPH 농도를 달리하였을 경우, free radical의 소거활성 정도는 DPPH 농도가 100 μM일 때 free radical 소거반응이 직선적으로 증가하였으며, 20분 후에는 90% 이상이 소거되었으므로 가장

적합한 것으로 사료되었다(그림 2). DPPH 300 μM 처리에서는 free radical 소거활성이 증가되었지만 반응 20분 후에도 그 활성은 50% 이하였으며, DPPH 농도가 25 μM인 경우 ascorbate의 첨가에 의해 8분 이내에 free radical 소거반응이 종료되었지만, 그 정도는 80% 이하로 나타나 상호간의 농도조합이 적합하지 않았다. 그러나, DPPH 농도 또한 실험자에 따라서 다양하게 보고 되어(Abe 등, 1998b; Martin 등, 2000; Kikuzaki 등, 2002; Ogata 등, 2002) 있으므로, 각각의 검색시료에 따라 적당한 DPPH 농도를 선정해야 할 것으로 생각되었다.

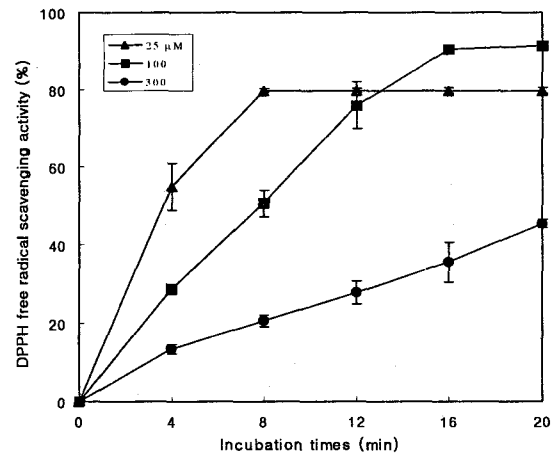


Fig 2. Effect of DPPH ethanolic solution on DPPH free radical scavenging activity. DPPH free radical activity for DPPH ethanolic solution (pH 7.8) was determined with ascorbate of 50 μM for 20 min.

적정 pH

100 μM로 조제한 DPPH 용액의 pH를 HCl 및 NaOH를 사용하여 2, 4, 6, 8 및 10으로 조정 한 다음 ascorbate 농도 50 μM, 반응시간 20분의 조건에서 free radical 소거활성을 측정 한 결과, DPPH 용액의 pH 2에서 8까지는 free radical 소거활성에 별다른 영향이 없었으며, pH 10에서만 소거활성에 영향을 미치는 것으로 나타났다(그림 3).

반응 액의 pH에 따라 검색하고자 하는 시료의 물리적인 성질이 변할 수 있으므로 검색시료가 가지고 있는 항산화능도 달라질 수 있기 때문에 DPPH 용액의 pH는 상당히 중요한 역할을 할 것으로 생각할 수 있다. 그러나 본 실험에서는 강산~약 알칼리까지

free radical 소거활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 DPPH 용액의 pH는 크게 고려하지 않아도 될 것으로 생각되었다. 왜냐하면 실제로 에탄올에 용해시킨 100 μM DPPH 용액은 pH가 7.8 정도이기 때문이다(자료 미 제시).

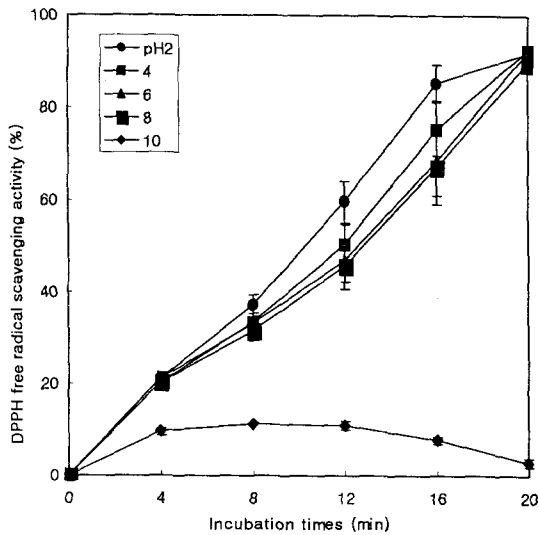


Fig 3. Effect of pH on DPPH free radical scavenging activity. DPPH free radical activity for pH was determined with 100 μM DPPH ethanolic solution and ascorbate of 50 μM for 20 min.

Ascorbate의 항산화활성

Ascorbate(vitamin C)는 채소나 과일류에 많이 함유되어 있는 vitamin 중의 하나로(Padh, 1990) 동물이나 식물에서 항산화제로서 중요한 역할을 하고 있다(Foyer와 Halliwell, 1976). Ascorbate는 활성산소 중에서 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 소거하는 대표적인 수용성 항산화제로 알려져 있다.

생물체는 이러한 ascorbate의 항산화작용에 의해 각종 효소 활성의 저하, 색소체 및 생체막의 파괴 등과 같은 산화 스트레스로부터 생체를 보호할 수 있게 된다(Foyer와 Halliwell, 1976; Gorden과 Beck, 1979; Nakano와 Asada, 1980). 본 실험방법을 적용하여 측정된 ascorbate의 항산화활성은 농도의존적인 반응을 보였는데(그림 4-A), DPPH 용액 100 μM , pH 7.8, 반응 시간 20분의 시험조건에서 ascorbate 농도를 10, 20, 30, 40 및 50 μM 로 처리하였을 때 free radical 소거활성은 각각 24.6, 46.7, 70.0, 89.8 및 95.2%로 증가하였다. 또한 이 결과는 DPPH free radical 소거에 관련된

기존의 연구결과(Martin 등, 2000; Kikuzaki 등, 2002; Ogata 등 2002)와도 유사한 경향이였다.

α -tocopherol의 항산화활성

α -tocopherol(vitamin E)은 ascorbate와 마찬가지로 생체 내에서 산화 스트레스에 대하여 강력한 항산화활성을 가지는 대표적인 지용성 항산화제(Pennock 등, 1964; Janiszowska와 Pennock, 1976)로 알려져 있으며, 이는 singlet oxygen($^1\text{O}_2$)과 alkyl peroxide를 효과적으로 소거시키는 능력을 가지고 있다(Battle 등, 1976). DPPH free radical 소거활성에 대한 α -tocopherol의 항산화활성 정도를 측정된 결과도 ascorbate 경우와 마찬가지로 농도의존적인 반응을 보이고 있었다(그림 4-B). 즉, α -tocopherol의 농도를 10, 20, 30, 40, 50 및 100 μM 로 처리하였을 때 free radical 소거활성은 각각 21.7, 31.0, 43.6, 48.3, 56.3 및 93.3%로 나타나 다른 연구결과(Martin 등, 2000; Kikuzaki 등, 2002)와 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 96-well plate를 이용한 free radical 소거활성 측정방법은 ascorbate와 α -tocopherol에 대한 다른 연구결과와 유사하기 때문에 보다 효과적으로 많은 화학물질들의 항산화활성을 측정할 수 있을 것으로 사료된다.

식물특정 효소저해제의 항산화활성

본 실험에 사용한 107개의 HIT-화합물은 여러 참고 문헌을 통하여 식물에서 특정 효소를 저해한다고 보고되어 있는 화합물로서 일부 저해제를 제외하고는 항산화작용에 대한 보고가 없는 화합물들이다. 이 107개의 HIT-화합물을 100 μM 로 처리하였을 때(자료 미 제시) 11개의 저해제는 70% 이상 free radical을 소거하는 것으로 나타났다(그림 5-A).

이 중에서 D-alanine carboxypeptidase I 저해제인 HIT-17 (ampicillin)과 phenylalanine ammonia lyase 저해제인 HIT-28(chlorogenic acid), HIT-51(ferulic acid) 및 HIT-52(gallic acid) 등은 90% 이상의 free radical 소거활성을 보였고, phenylalanine ammonia lyase 저해제인 HIT-24(caffeic acid), polyphenol oxidase 저해제인 HIT-65(kojic acid), lipoxygenase 저해제인 HIT-75 (nordihydroguaiaretic acid)와 amine oxidase 저해제인 HIT-84(phenylhydrazine) 등은 85% 이상의 소거활성을 발휘하는 것으로 나타났으며, 이들에 대한 선행연구 결과(Cuvelier 등, 1992; Carrer 등, 1998; No 등, 1999;

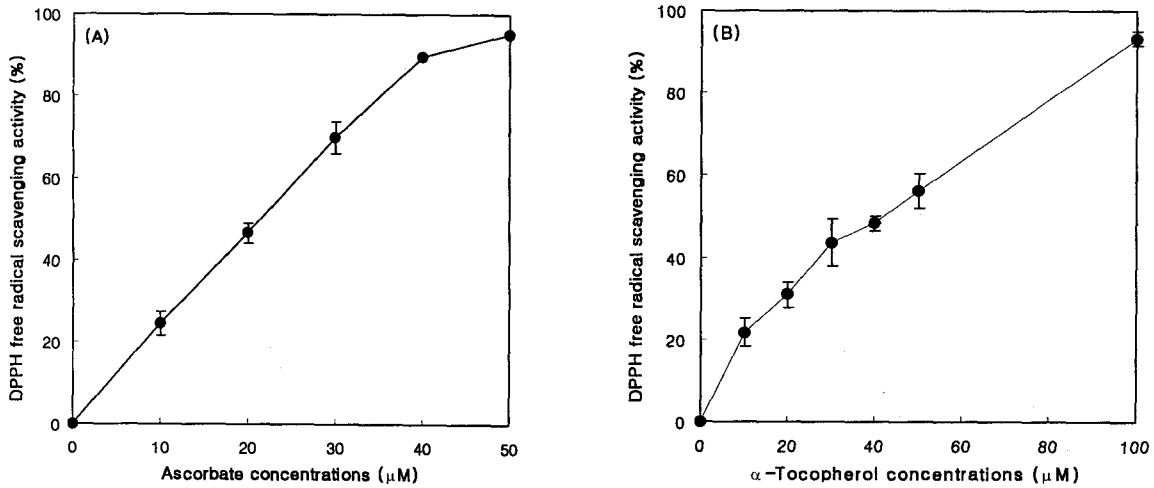


Fig 4. Dose-dependent effect of ascorbate (A) and α-tocopherol (B) on DPPH free radical scavenging activity. DPPH free radical activity for ascorbate and α-tocopherol was determined with 250 μL total reaction volume containing 100 μM DPPH ethanolic solution (pH 7.8) for 20 min.

Burdock 등, 2001; Kikuzaki 등, 2002; Kweon 등, 2001; Bhasin 등, 2002; Imai 등, 2002)와도 유사한 경향을 나타냈다. 그러나, HIT-74(niclosamide), HIT-92(pyridoxal), HIT-104(tranlylcypromine) 등에 대한 항산화 관련 연구보고는 발견할 수 없었으며, 이 물질들의 활용가치는 추가적으로 검토되어야 할 것이다.

을 때 30여 개의 추출물들이 free radical 소거활성을 보여(자료 미 제시) 50 μg/mL 농도로 재처리하였는데, 이 농도에서 11개의 추출물들은 70% 이상의 free radical 소거활성을 나타내었다(그림 5-B).

한편, AT-407은 조추출물(crude extract)임에도 불구하고 50 μg/mL에서도 free radical 소거활성이 90.1%로 높게 나타나 천연물 유래의 새로운 항산화제로서의 가능성에 대한 검토가 필요할 것으로 생각되었다.

식물 추출물의 항산화활성

100개의 식물 추출물을 500 μg/mL 농도로 처리하였

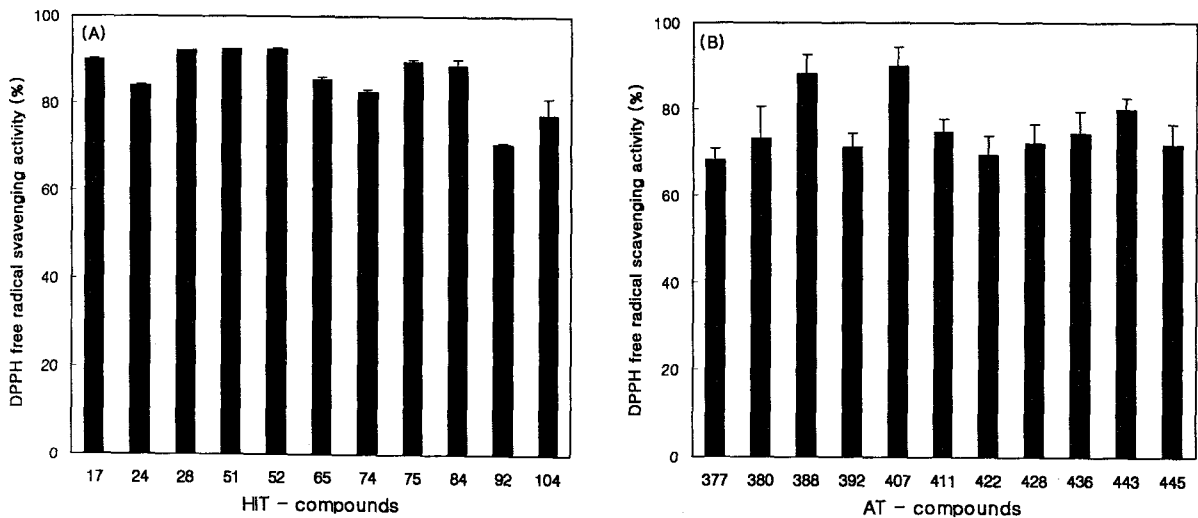


Fig 5. Effect of plant-specific enzyme inhibitors at 100 μM (A) and plant crude extracts at 50 μg/mL (B) on DPPH free radical scavenging activity.

인용문헌

- Abe, N., T. Murata, and A. Hirota (1998a) Novel oxidized sorbicillin dimers with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-radical scavenging activity from a fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62:2120~2126.
- Abe, N., T. Murata, and A. Hirota (1998b) Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62:661~666.
- Abe, N., and A. Hirota (2002) Chemical studies of the radical scavenging mechanism of bisorbicillinol using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Commun.* pp.662~663.
- Baek, S. H., I. S. Kwon, T. I. Park, S. J. Yun, J. K. Kim, and K. G. Choi (2000) Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:385~390.
- Battle, R. W., J. K. Gaunt, and D. L. Laidman (1976) The effect of photoperiod on endogenous α -tocopherol and plastochromanol in leaves of *Xanthium strumarisum* L. (Cocklebur). *Biochem. Soc. Trans.* 4:484.
- Benzi, G., and A. Moretti (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?. *Neurobiol. Aging* 16:661~674.
- Bhasin, G., H. Kausar and M. Athar. (2002). Low iron state is associated with reduced tumor promotion in a two-stage mouse skin carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicol.* 40:1105~1111.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181:1199~1200.
- Burdock, G.A., M.G. Soni and I.G. Carabin (2001) Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 33:80~101.
- Carrer, R., G. Deby-Dupont, C. Deby, L. Jadoul, M. Mathy (1998) Oxidant-scavenging activities of beta-lactam agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 17:43~46.
- Cuvelier, Marie-Elisabeth, H. Richard, and C. Berset (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:324~325.
- Foyer, C. H., and B. Halliwell (1976) Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21.
- Groden, D., and E. Beck (1979) H_2O_2 destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 546:426.
- Handelman, G. J., G. Cao, M. F. Walter, Z. D. Nightingale, G. L. Paul, R. L. Prior, and J. B. Blumberg (1999) Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* 12:4888~4893.
- Imai, Y., H. Kolb, and V. Burkart. (2002) Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* 197:105~109.
- Janiszowska, W., and J. F. Pennock (1976) The biochemistry of vitamin E in plants, in *Vitamins and Hormones: Advance in Research and Applications.* Munson, P. L., Glover, J., Diczfauly, E., and Olson, R. E., Eds., vol. 34, Academic Press, New York. 77.
- Kikuzaki, H., M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, and H. Taniguchi (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50:2161~2168.
- Kweon, M. H., H. J. Hwang, and H. C. Sung (2001) Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Agric. Food Chem.* 49:4646~4655.
- Kwon, S. Y., Y. J. Jeong, H. S. Lee, J. S. Kim, K. Y. Cho, R. D. Allen, and S. S. Kwak (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress. *Plant, Cell and Environ.* 25:873~882.
- Martin, T. S., H. Kikuzaki, M. Hisamoto, and N. Nakatani (2000) Constituents of *Amomum tsao-ko* and their radical scavenging and antioxidant activities.

- JAOCS. 77:No 6.
- Nakano, Y., and K. Asada (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21:1295.
- No, J. K., D. Y. Soung, Y. J. Kim, K. H. Shim, Y. S. Jun, S. H. Rhee, T. Yokozawa, and H. Y. Chung (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci.* 21:241~246.
- Oberley, T. D., J. L. Schultz, N. Li, and L. W. Oberley (1995) Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol. Med.* 19:53~65.
- Ogata, S., M. Takeuchi, S. Teradaira, N. Yamamoto, K. Iwata, K. Okumura, and H. Taguchi (2002) Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Bio. Biotechnol. Biochem.* 66:641~645.
- Ottino, P., and J. R. Duncan (1997) Effect of α -tocopherol succinate on free radical and lipid peroxidation levels in BL6 melanoma cells. *Free Radical Bio. Med.* 22:1145~1151.
- Padh, H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.* 68:1166.
- Pastore, D., D. Trono, L. Padalino, S. Simone, D. Valenti, N. DiFonzo, S. Passarella (2000) Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *J. Cereal Sci.* 31:41~54.
- Rohrdanz, E., and R. Kahl (1998) Alteration of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radical Biol. Med.* 24:27~38.
- Salin, M. L. (1988) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. *Physiol. Plant* 72:681.
- Shull S., N., H. Heints, M. Periasamy, M. Manohar, Yvonne MW Janssen, Joanne P Marsh, and Brooke T Mossman (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* 266:24398~24403.
- Traber, M. G. (1997) Vitamin E, oxidative stress and 'healthy ageing'. *Eur. J. Clin. Invest.* 27:822~824.
- 김안근, 김지현 (2001) 산화적 스트레스 및 항산화제가 항산화효소 활성에 미치는 영향. *응용약물학회지.* 9:249~257.
- 허선경, 김선숙, 허연희, 안수미, 이병근, 이상국 (2001) 포도나무가지 추출물의 프리라디칼 소거작용 및 염증발현 매개인자 생성 억제 효과. *응용약물학회지.* 9:188~193.
- 황인택, 최정섭, 박상희, 이관희, 이병희, 홍경식, 조광연 (2001) 식물 특정효소저해제의 생물 활성조사에 의한 신규제초제 작용점 탐색. *한국농약과학회지.* 5:36~45.

Application and High Throughput Screening of DPPH Free Radical Scavenging Activity by Using 96-Well Plate

Jung-Sup Choi*, Jung-Im Oh, In-Taek Hwang, Sung-Eun Kim¹, Jae-Chul Chun¹, Byung-Hoi Lee, Jin-Seok Kim, Tae-Joon Kim, and Kwang-Yun Cho (*Korea Research Institute of Chemical Technology, Jang-dong 100, Yusong, Taejeon 305-600, Korea*, ¹*Division of Applied Biotechnology, College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea*)

Abstract : A 96-well plate was applied to determine the DPPH free radical scavenging activity using 107 plant-specific enzyme inhibitors and 100 unknown plant-originated extracts. The final optimum volume was 250 μ L containing 100 μ M DPPH ethanolic solution at pH 7.8. In this condition, the radical scavenging activities were significantly increased by two known antioxidants consisting of ascorbate and α -tocopherol in a concentration-dependent manner. Among the 107 inhibitors, ampicillin and gallic acid showed 90.2% and 92.6% antioxidant activity at 100 μ M, respectively, and these results were consisted with previous findings. In the tested 100 natural materials at 50 μ g/mL, antioxidant activity of AT-407 resulted in the highest of 90.1%, and 10 extracts including AT-388 and AT-443 showed over 70%. Our results suggest that the use of 96-well plate for determining DPPH free radical scavenging activity would be a suitable method to select antioxidant-like substances of both synthetic compounds and natural products.

*Corresponding author (Fax : +82-42-861-4913, E-mail : jschoi@kriict.re.kr)