

초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.) 줄기의 항산화 활성

† 백 홍 석 · 나 영 수² · 류 병 호¹ · 송 승 구
부산대학교 화학공학과, Newchem R&D Center², 경성대학교 식품공학과¹
(접수 : 2003. 4. 8. 게재승인 : 2003. 7. 22.)

Antioxidant Activities of *Stachys sieboldii* MIQ. Stalks

Hong-Seuk Baek,† Young-Soo Na², Beung-Ho Ryu¹, and Seung-Koo Song
Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
²Newchem R&D Center, 182 Bukjeong-Dong, Yangsan 626-110, Korea
(Received : 2003. 4. 8. Accepted : 2003. 7. 22.)

This study was worked out to investigate the compounds of antioxidant constituents extracted from *Stachys Sieboldii* MIQ. and their effects on antioxidant activity by DPPH method, ferric thiocyanate method, and nitrite scavenging ability. Solvents such as methanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water were used for this purpose. Total concentrations of polyphenols and flavonoids were measured in the methanol fraction. The ethyl acetate fraction showed the strongest activity by DPPH method, ferric thiocyanate method, and nitrite scavenging ability.

The ethyl acetate extract was fractionated on a silica gel column using elution solvent (chloroform : methanol : water = 70 : 30 : 5 lower phase) at a flow rate of 1.0 mL/min. UV-VIS spectral data of each fraction showed adsorption maxima in the range of 284~330 nm. Among fractions, the fraction 1 that has λ_{max} (nm) of 284 nm showed the strongest activity by DPPH method. The UV-VIS spectral data of phenolic compounds were known to lie in the range of 210~290 nm and 300~550 nm. Therefore, the results of our study suggested that *Stachys sieboldii* MIQ. contains phenolic compounds showing natural antioxidant activity.

Key Words : *Stachys Sieboldii* MIQ., antioxidant activity, fractionation.

서 론

산소는 인간을 포함한 호기성 생물의 생존에 필요 불가결한 요소이지만, 경우에 따라 반응성이 높은 활성 산소로 변하기도 한다. 활성 산소란 활성이 강한 산소 종을 의미하며 초과산화물 (superoxide), 초과산화 음이온 (superoxide anion), 과산화수소 또는 수산화 라디칼 등이 이에 속한다. 이들은 반응성이 매우 큰 자유 라디칼로 개시, 증식, 그리고 종결의 과정을 거치며 이 때 산소가 독성을 나타낸다. 생물체는 빛수가 경과함에 따라 자유라디칼 제거능력이 점진적으로 감소되므로 활성산소로부터 파생된 자유 라디칼이 축적되어 면역체계의 작용이 감소되고 있다고 알려져 있다(1).

이러한 활성 산소 종으로부터 자신을 보호하기 위하여 인체는 유해산소제거효소 (SOD), 카탈리아제 (CAT) 등의 방어

시스템에 의하여 활성 산소 소거 기능을 한다. 이들 항산화 효소들은 O_2 , H_2O_2 , 유기 과산화수소, 그리고 OH 라디칼 등의 독성을 해소 또는 약화시킴으로써 그 기능을 나타낸다. 다른 한편으로는 황록색 야채의 섭취를 통해 식물체내 다양한 항산화 물질이 활성 산소종을 소거하거나 발생을 억제시키거나, 생성물로서의 연쇄반응을 차단하는 역할을 한다. 이러한 현상은 식물체 내의 2차 대사 산물이 생체에 대한 활성을 나타내고 있기 때문이며 그 중 가장 광범위하게 분포되어 있는 것이 phenolic compounds이다. Phenolic compounds는 생체 내에서 노화 방지와 항산화, 항암, 항바이러스, 및 항염 같은 활성을 나타내는 것으로 보고되어져 있다(2-3). 그 중 주요 항산화를 나타내는 phenolic compounds로는 phenolic acids, carnosol derivatives, flavonoids 등이 있다(4).

본 연구에 사용된 초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.)은 labiate 과로 중국의 전통적인 건강채소로서 Chinese artichoke, Japanese artichoke, crosne, knotroot(5)로 불리며 중국, 일본 및 러시아 등에서 주로 재배되고 있다. 1년생 본초로 직립이며, 뿌리의 형태가 동충하초와 모양이 비슷하고 약효도 비슷하여 식물의 동충하초라 불리운다. 일본에서는 정월 요리에

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Tel : +82-51-510-3082 Fax : +82-51-512-8563
E-mail : p3707@hanmail.net

귀하게 사용되기도 한다. 중국의 중약편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매, 또는 장을 강화하는 장수채로 알려져 있으며, 연구에 의하면 항 산소 결핍 활성(6), hyarulonidase 억제 활성(7) 또는 면역 거부 활성(8) 등이 있음이 알려져 있다.

본 연구에서는 초석잠의 기능성 연구의 일환으로 초석잠 줄기의 항산화 활성도와 폐놀성 화합물의 존재를 밝혀 기능성 소재의 식품소재로서의 이용가능성에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 초석잠은 경남 밀양시 산외면 야산에서 직접 채배한 것이다. 가을에 추수한 초석잠을 부분별로 잘라서 바람이 잘 통하는 그늘에서 15일간 건조하여 분쇄기로 분쇄하였다. 용매로 사용한 메탄올, 클로르포름 (Fisher science)은 특급 시약이고, 나머지 용매들은 Junsei사의 1급 시약이다. 칼럼용 silical gel 60과 thin-layer chromatography silica gel 60 F254는 Merck사에서, 항산화 활성도 측정을 위한 1,1-diphenyl- 2-picryl hydrazyl (이하 DPPH라 표기함), butylated hydroxytoluene (이하 BHT라 표기함), butylated hydroxyanisole (이하 BHA라 표기함), α-tocopherol 등은 sigma사의 시약용이다. 시료 추출을 위해 사용된 용매를 증류시키기 위해 회전식 감압 증류장치 (Yamato RE440A, Japen)와 흡광도를 측정하기 위해 UV/VIS 분광광도계 (Perkin Elmer, Germany)를 사용하였다.

시료의 추출

분쇄된 줄기 건조물을 Fig. 1과 같은 계통으로 분획 추출 하였다. 580 g의 줄기 분쇄 건조물을 메탄올 4 L로 15시간씩 3회 추출하고 GF/C (47 mmφ, Whatman)로 감압 여과 시킨 후 회전식 감압 증류 장치로 농축시켰다. 농축물을 300 mL의 3차 증류수에 녹인 후 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 1 : 1의 비율로 혼합한 후 분액여두를 사용하여 3시간씩 3회 반복 분획하였다. 각각의 분획물은 농축하여 시료 건조물량에 대한 백분율로 추출 수율을 계산하였다.

Total polyphenol 과 flavonoid 함량 측정

초석잠 줄기의 total polyphenol 함량을 Folin-Denis법(9)으로 측정하였다. 메탄올 추출물 (99%메탄올 1 mL에 추출물 500 μg을 용해) 용액 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL을 섞어 3분간 실온에서 방치한 후, Na₂CO₃ 포화 용액 0.2 mL을 가하여 잘 섞고 증류수로 2 mL가 되게 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 방치하였다. 그 후, 3,000 G에서 10분 동안 원심분리하고 그 상등액을 취하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid의 농도가 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL이 되도록 하여 작성한 검량선으로 측정된 흡광도를 농도로 환산하였다.

Total flavonoid 함량은 메탄올 추출물 (99%메탄올 1 mL에 추출물 500 μg을 용해)에 diethyleneglycol 2 mL, 1N-NaOH 0.02 mL을 가한 후, 37 °C 항온조에서 1시간 동안

방치 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다(10). 이 때 Rutin의 농도가 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL이 되도록 하여 작성한 검량 선으로 농도를 산출하였다.

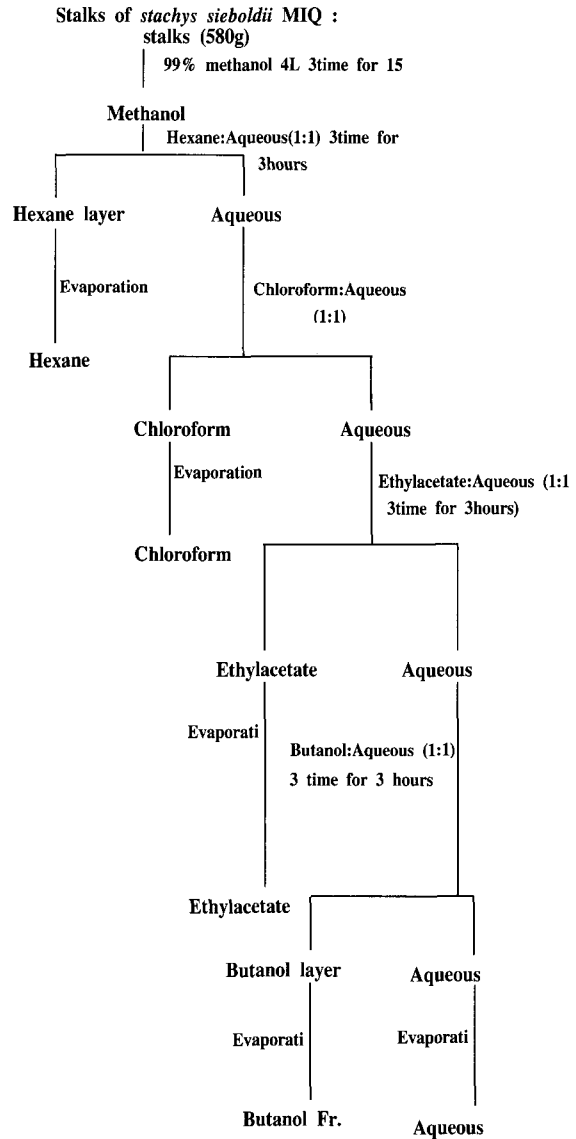


Figure 1. Flow chart for solvent fractionation of *Stachys sieboldii* MIQ..

DPPH에 의한 수소 공여능 측정

DPPH는 비교적 안정한 라디칼로 메탄올에 녹이면 보라색을 나타내지만 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하면 색이 손실된다. 이러한 성질을 이용하여 간단하게 항산화 활성을 측정할 수 있다(11). 각 용매 별로 분획하여 추출한 시료를 각각 4,000 μg, 2,000 μg, 1,000 μg, 600 μg, 250 μg, 125.13 μg, 15.64 μg, 7.81 μg, 1.95 μg을 취해서 메탄올 4 mL에 녹인 후, 1.5×10⁻⁴ M DPPH 메탄올 용액 1 mL를 첨가하였다. 그 후 대조군 BHA, BHT, α-tocopherol과 함께 30분간 실온에서 방치 한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화 지질 형성 억제능 측정

과산화지질 형성 억제능 측정은 linoleic acid를 자동산화 모델로 하여 측정하였다(12). 시험액 조제를 위해 20 mL 유리병에 linoleic acid 용액 (linoleic acid 2.5 mg을 메탄올 1 mL에 용해) 0.57 mL와 1 M phosphate buffer (pH 7.0) 2.25 mL를 넣고, 메탄올에 각각 10 mg/mL 농도로 희석한 추출물을 30 µL씩 첨가하였다. 자동 산화를 진행시키기 위해 시험액을 차광시킨 3840 °C의 배양기에 투입하여 매일 생성되는 과산화물의 양을 ferric thiocyanate 방법으로 측정하였으며, 대조군으로 BHA, BHT, α-tocopherol를 사용하였다. 즉 배양된 시험액 50 µL와 75% 메탄올 4.85 mL를 시험관에 넣고 잘 섞은 후, 30% ammonium thiocyanate 50 µL를 반응액에 가한 후 3분 동안 반응시키고 3.5% 염산 용액에 녹인 20 mM ferrous chloride 50 µL를 반응액에 가하여 나타나는 붉은색을 UV/VIS 분광 광도계를 이용하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거능 측정

Kato 등(13)의 방법으로 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 각 시료 (증류수 1 mL에 추출물 1 mg을 용해)를 1 mL씩 가하고, 0.1 N HCl, 0.2 M 구연산 완충액으로 pH 1.2, 3.03, 5.97으로 조절한 후 반응 용액의 부피를 10 mL로 맞췄다. 이 용액을 37 °C에서 1시간 반응 시킨 후 각 반응액 1 mL를 취해 2% 초산용액 2 mL와 30% 초산 용액으로 용해한 griss reagent 0.4 mL를 가한 후 실온에서 15분 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 무 첨가구의 흡광도에 대한 시료 첨가구의 흡광도의 백분율로 나타내었다.

칼럼 크로마토그래피

항산화 활성도가 가장 높음을 나타낸 에틸아세테이트의 추출물을 실리카겔 칼럼 (직경: 3 cm, 길이: 67 cm, 입자크기: 63200 µm)을 사용하여 분리하였다. 용출 용매로는 클로로포름 : 메탄올 : 증류수 (70 : 30 : 5)의 하층을 이용하였다. 칼럼의 맨 위 부분에 소량의 메탄올에 녹인 에틸아세테이트 추출물을 넣고 1.0 mL/min의 속도로 용출 용매를 전개 시켜 총 5개의 분획으로 나누었으며, 용출 용매를 제거하기 위해 회전식 감압 증류장치를 이용하였다. 각각의 분획은 DPPH방법을 이용해 항산화 활성도가 측정되고, UV/VIS 분광 광도계로 흡광도파장이 측정되었다.

박층 크로마토그래피

박층 크로마토그래피는 칼럼 크로마토그래피의 분획을 5개의 분획으로 분류하기 위해 사용되었다. 전개 상으로는 클로로포름 : 메탄올 : 증류수 (70 : 30 : 5)의 하층이 사용되었으며 UV light 검출기와 10% H₂SO₄에 1%의 Ce(SO₄)를 녹인 발색제가 사용되어 R_f 값이 구해졌다.

결과 및 고찰

초석잠의 메탄올 추출물에서 total polyphenol 과 flavonoid의 함량을 측정하여 Table 1에 나타내었으며, 활성 성분에

대한 특성을 검토하고자 극성이 다른 유기 용매인 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올 순으로 순차적으로 추출물을 용출하여 얻은 수율을 Fig. 2에 나타내었다. 건조시켜 가루 상태의 초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.) 580 g을 메탄올로 추출하여 39.21 g (6.75%)의 추출물을 얻었으며 이중 38.41 g을 취하여 hexan 추출물에서 1.23 g (3.125%), 클로로포름, 3.22 g (8.38%), 에틸아세테이트, 3.23 g (8.41%), 부탄올, 3.53 g (9.19%), 증류수, 26.88 g (69.98%)의 추출물을 각각 얻었다. 그 중 에틸아세테이트의 추출물에서 높은 항산화 활성도를 보여 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 다시 분획하였다.

Table 1. Amounts of polyphenols and flavonoids extracted with methanol from *Stachys sieboldii* MIQ. stalks

	polyphenols	flavonoids
Contain volume(%)	1.97	0.75

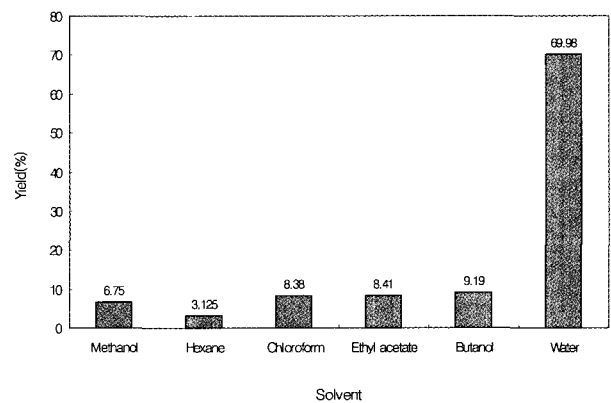


Figure 2. Relative amounts of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MIQ. stalks.

DPPH에 의한 항산화 활성도 측정

각 용매별로 추출한 시료의 DPPH에 의한 자유 라디칼 소거작용을 측정하여 라디칼의 50%를 소거시키는 농도 값을 RC50으로 표시하였으며 Fig. 3에 각 추출 시료의 비교 값을 나타내었다. 메탄올 (225 µg)추출물을 기준으로 각 용매 추출물의 RC50 값을 보면 에틸아세테이트 추출물 (15 µg)이 가장 높은 활성도 값을 나타내었으며 그 다음으로 부탄올 (50 µg), 클로로포름 (170 µg) 추출물 순으로 활성도를 나타내었고 hexan (490 µg), 증류수 (570 µg) 추출물은 메탄올보다 낮은 활성도를 나타내었다. 특히 에틸 아세테이트와 부탄올 추출물은 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA (20.6 µg), BHT (100 µg), α-tocopherol (21.8 µg)과 대등하거나 높은 활성도를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

과산화 지질 (linoleic acid) 형성 억제능 측정

활성 산소는 우리 몸의 지질 (주로 불포화 지방산)과 결합하여 과산화 지질로 변화된다. 이러한 과산화 지질은 생체 내에서 효소를 불활성화시키고 호르몬 생합성을 저하시킬 뿐

아니라, 외부 환경이나 자극에 대한 방어능력을 상실하게 하여 각종 성인병을 유발시킨다. 특히 linoleic acid (C₁₈H₃₂O₂)는 2개의 이중결합을 가지는 불포화지방산으로 공기 중에서 산화되기 쉬운 건성유이다. 이러한 과산화 지질 (linoleic acid)에 대한 형성 억제능 측정 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 9일 동안 측정된 결과 증류수 추출물은 control과 같은 양상으로 1일이 지난 후 흡광도가 0.1에서 0.3으로 변화하며 급격한 산화 현상을 보이고 있고, 에틸아세테이트 추출물을 제외한 다른 용매 역시 5일 후부터는 초기 흡광도보다 2배 이상 높아지며 산화가 시작됨을 보이고 있었다. 에틸아세테이트 추출물은 대조군으로 사용된 BHA, BHT, α-tocopherol과 비슷하게 9일 동안 흡광도의 변화를 보이지 않으면서 지속적인 과산화 지질 형성 억제능을 보여 주고 있었다.

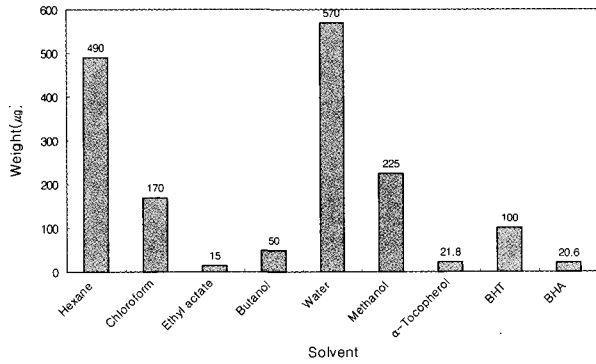


Figure 3. Antioxidant activity of the extracted fractions from *stachys sieboldii* MiQ. stalks by DPPH method.

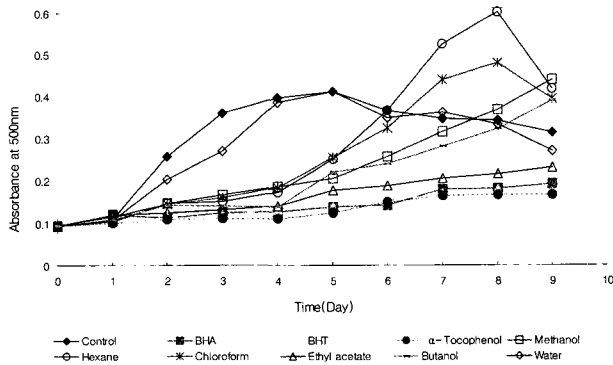


Figure 4. Antioxidant activity of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MiQ. stalks on the autooxidation of linoleic acid by ferric thiocyanate method.

아질산염 소거능 측정

아질산염은 육제품의 발색과 *Clostridium botulinum* 성장저해제로 각종 식품에 첨가되고 있다. 질산염은 식물체 내, 소화기관 및 식품의 저장과정에서 질산환원효소, 환원세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 질산염이 많이 함유된 식품을 다량 섭취하게 되면 methemoglobin 증 등의 중독 증상과 아질산염과 제 2급 및 3급 아민과의 nitroso화 반응이 위장내의 낮은 산성조건에서 쉽게 일어나서 발암물질인

nitrosamine을 생성할 수도 있다(14). 아질산염의 nitrosamine화 반응이 인체와 유사한 pH에서 최적 조건을 가지므로 각 추출물의 pH 1.2, 3.03, 5.97에서 아질산염의 분해작용을 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH가 낮아수록 높은 소거능을 보였으며 특히 pH 1.2에서는 핵산을 제외한 모든 추출물군에서 90% 이상의 분해능을 보이고 있다. pH 3.03 과 pH 5.97에서는 에틸아세테이트 추출물이 각각 83.26%, 45.55%를 나타내며 다른 추출물에 비해 우수한 소거능을 보이고 있다.

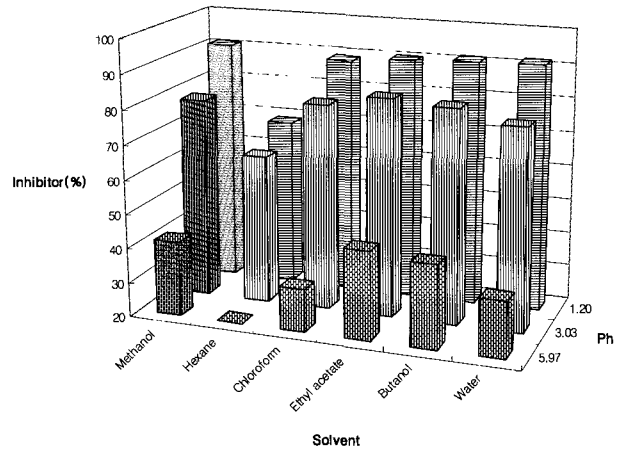


Figure 5. Nitrite scavenging ability of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MiQ. stalks.

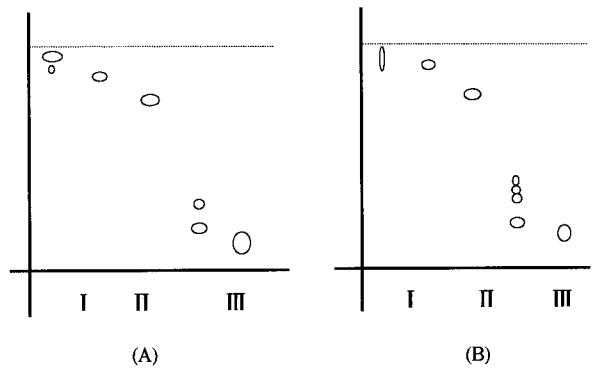


Figure 6. TLC of the fraction separated from the silica gel column chromatography of the ethyl acetate extract from *Stachys sieboldii* MiQ. stalks (A) under 1% Ce(SO₄)/10% H₂SO₄; (B) under UV light 254nm.

박층 크로마토그래피를 이용한 칼럼 크로마토그래피 분획물의 분리

박층 크로마토그래피는 일정 두께를 가진 박층의 흡착제를 고정상으로 하고, 이동하는 용매상과 고정상에 대한 친화력이 물질에 따라 다른 것을 이용한 분리분석법으로 분리된 이동거리 Rf를 측정하였다. 실리카겔 칼럼을 이용해 1 mL/min 속도로 용출시킨 에틸아세테이트의 추출물을 박층 크로마토그래피를 이용해 64개의 fraction을 같은 Rf 값을 가지고 있는 5개의 분획으로 나누었고 이를 각각 ES-1 (17), ES-2 (8

15), ES-3 (1629), ES-4 (3043), ES-5 (4464)로 명명하였다. 분리되어진 띠의 확인은 UV 254 nm와 1% Ce(SO₄)/10% H₂SO₄를 이용하였으며 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 5개 분획의 대표 Rf값은 ES-1 (0.96), ES-2 (0.91), ES-3 (0.82), ES-4 (0.24), ES-5 (0.2)로 나타났다.

Table 2. UV/VIS spectral data for the fractions of ethyl acetate from *Stachys sieboldii* MiQ. stalks by silica gel column chromatography

fraction	$\lambda_{max}(nm)$
ES-1	284
ES-2	284
ES-3	287,326
ES-4	322,290
ES-5	330

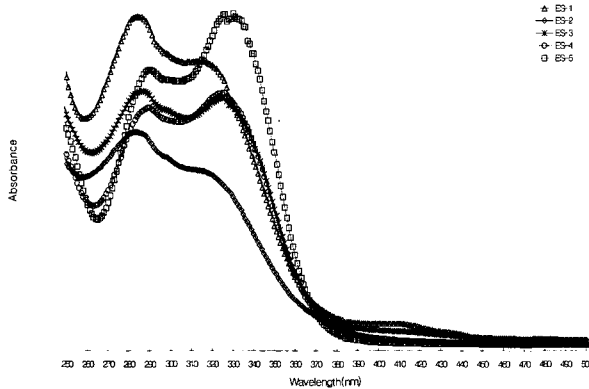


Figure 7. UV/VIS spectral scan for the fractions of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MIQ. stalks by silica gel column chromatography.

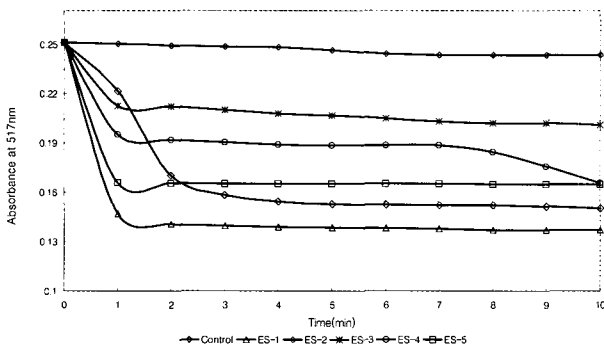


Figure 8. Antioxidant activity of the isolated fraction of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MIQ. stalks by silica gel column by DPPH method.

칼럼 크로마토 그래피를 이용한 에틸아세테이트 추출물의 분리 및 항산화 활성 측정

DPPH를 통한 전자 소거능, 산화 지질 형성능 억제율과, 아질산염 소거능 측정을 통해 에틸아세테이트의 추출물이 가장 높은 항산화 활성도를 나타내었으므로, 물질의 특성을 고찰하기 위해 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분획하였다. 각 분획별 흡광도의 변화를 Fig. 7에 나타내었으며 최대 흡광도 값을 Table 2에 나타내었다. 칼럼 분획물은 284-330 nm 사이에서 높은 흡광도를 나타내고 있으며 최대 흡광

도가 284 nm에서 점차 330 nm로 이동하는 양상을 보이고 있다. 각 분획을 DPPH법을 이용해 항산화 활성도를 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 최대흡광도 값이 284 nm인 ES-1이 가장 높은 활성도를 나타내고 있으며 330 nm인 ES-5도 다른 분획에 비해 양호한 활성을 보이고 있다. Phenolic acids 과 flavonoids의 UV-VIS spectral data의 양상은 크게 200~400 nm 사이에 나타난다고 추정되고 있으며(15), 각 과정에서 광범위하게 분리되어진 flavonoids의 UV-VIS spectral data는 210~290 nm와 300~550 nm에서 최고값을 나타낸다 하였다(16). 이 중 280~290 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 물질에는 rosmanol (284 nm), epiisorosmanol (288 nm), epiisorosmanol methyl ether (288 nm), epiisorosmanol ethyl ether (288 nm), carnosic acid (284 nm), methyl carnosate (282 nm)가 알려져 있고 330 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지는 물질에는 rosmarinic acid (328 nm), homoplantagin (334 nm), crsimaritin (334 nm), 4-methoxytecto hrysin (332 nm), genistein (330 nm)가 알려져 있다(15, 17). 이러한 범위는 초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.)에서 항산화 활성도가 높은 부분만을 취해 분획하여 나타난 UV-VIS spectral data의 범위와 같으므로 본 연구의 추출물 중에도 여러 phenolic compounds가 존재함을 추증할 수 있으며, 보다 정확한 구조는 차후 실험에서 C-NMR, H-NMR, IR 등을 이용해 밝히고자 한다.

요 약

아직 국내에서는 드물게 경작되고 있지만 이미 옛 고서적에 나와 있는 초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.)에는 많은 유용한 물질이 있음을 알 수 있었다. 줄기의 메탄올 추출물 100 mg을 메탄올 20 mL에 녹여 만든 샘플에서 total polyphenol 과 flavonoid가 각각 9.33 $\mu\text{g/mL}$ (1.97%), 3.77 $\mu\text{g/mL}$ (0.75%)씩 함유되고 있음을 알 수 있으며 각 유기 용매층의 추출물의 항산화 활성도를 비교해 본 결과 DPPH법을 통해 기존의 항산화제인 α -tocopherol (21.8 μg), BHT (100 μg) 그리고 BHA (20.6 μg)와 비교해도 에틸아세테이트 (15 μg), 부탄올 (50 μg) 추출물의 항산화능이 뒤지지 않음을 알 수 있었다. 또한 과산화 지질 형성 억제능과 아질산염 소거능 조사에서 에틸아세테이트의 추출물이 가장 높은 활성도를 나타내었으며 기존의 항산화제들과 비슷한 효능을 나타내었다. 이를 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용해 다시 분획하였고 UV/VIS 흡광광도계를 통해 최대 흡광도의 파장은 280-330 nm 사이에 나타내었다. 그 중 최대 흡광도가 284 nm인 ES-1에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 일반적으로 알려져 있는 phenolic compounds의 UV-VIS spectral data와 일치하며 다양한 phenolic compounds가 초석잠 (*Stachys sieboldii* MIQ.) 속에 함유되어 있음을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 2001년도 농림부 농림기술 관리센터의 지원에 의하여 수행되었으면 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Pike, J. and R. K. Chandra (1995), Effect of vitamin trace element supplementation on immune indices in healthy elderly, *Int. J. Genome. Res.* **65**, 117-120.
2. Hertog, M. G. L. and P. C. H. Hollman (1996), Potential health effects of the dietary flavonoid quercetin, *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, 63-66.
3. Benavente-Garcisa, O., J. C. Marrin, F. R. Ortuno, and A. Rio (1997), Uses and properties of citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4505-4515.
4. Cuvelier, M. E., H. Richard, and C. Berset (1996), Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant commercial extract of sage and rosemary, *JAOCs*, **73**, 645-652.
5. International Society for Horticultural Science (1990), Elsevier's dictionary of horticultural and agricultural plant production, 20th ed., p72, Elsevier Science Publication.
6. Yamahara, J., T. Kitani, H. Kobayashi, and Y. Kawahara (1990), studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II Anti anoxia action and the active constituents, *Yakugaku Zasshi* **110**, 932-935.
7. Takeda, Y., T. Fujita, T. Satoh, and H. Kakegawa (1985), On the glycoside constituents of *Stachys sieboldii* MIQ. and their effects on hyaluronidase activity. *Yakugaku Zasshi* **105**, 955-959.
8. Sasaki, H., H. Nishimura, and T. Morita (1989), Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*, *Plant Med.* **55**, 485-462.
9. Swain, T. and W. E. Hillis (1959), The phenolic constituents of *Prunus domestica* (L.) The quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Agric. Food Chem.* **10**, 63-68.
10. Lee, Y. C., K. H. Hwang, and D. H. Han (1997), Composition of *Opuntia ficus-indica*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 847-853.
11. Blois, M. S. (1958), Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
12. Tomohiro, T., F. Kitani, N. Watanabe, A. Yagi, and K. Askata (1994), A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Bio. Biotech. Biochem.* **58**, 1978-1983.
13. Kato, H., I. E. Lee, N. V. Chuyen, S. B. Kim, and E. Hayase (1987), Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins, *Agric. Biol Chem.* **51**, 1333-1338.
14. Kim, D. K. (1999), Studies on the analysis of antioxidative compounds extracted from Korean *Rhus verniceflua* STOCKES and their biological activities., M.S. Thesis, Dept. of Genetic Engineering, Soon Chun Hyang University, Chung-Nam.
15. Cuvelier, M. E., H. Richard, and C. Berset (1996), Antioxidative activity and phenolic comparison of pilot-plant and commercial extract of sage and rosemary, *JACOS* **73**, 645-652.
16. Markham, K. R. (1982), *Techniques of Flavonoid Identification*, 1st ed., p36, Academic Press, New York.
17. Dan, E. P., D. P. Carmine, L. P. William, and J. W. Giffey (1981), Phenolic antioxidant of soy protein hydrolyzates, *J. Food Sci.* **47**, 24-25.