

초석잠(*Stachys sieboldii* MIQ) 뿌리 추출물의 항산화 활성 고찰

백홍석* · 나영수² · 김도한 · 이칭한 · 류병호¹ · 송승구

부산대학교 화학공학과, ¹경성대학교 식품공학과

Received August 20, 2003 / Accepted October 27, 2003

Antioxidant Activities of *Stachys sieboldii* MIQ Roots. Hong-Seuk Baek*, Young-Soo Na², Do-Han Kim, Chang-Han Lee, Beung-Ho Ryu¹ and Seung Koo Song. Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735 Korea, ¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea, ²Newchem R&D Center, 182 Bukjeong-Dong, Yangsan-City 626-110, Korea - The root of *Stachys Sieboldii* MIQ was extracted three times with methanol and extract was found to contain 3.02% of polyphenols and 1.97% of flavonoids. DPPH radical scavenging method, ferric thiocyanate method, and nitrite scavenging ability method were employed to investigate the constituents of the extract and to measure their activity on antioxidation. The fraction extracted by ethylacetate showed higher anti oxidation value than that of α -tocopherol, butylated hydroxyanisole (BHA), and butylated hydroxytoluene (BHT) at the same concentration. UV-VIS spectral data of the extract by ethylacetate that was isolated on a silica gel column proved adsorption maxima in the range of 280~330 nm. The fraction ES-R5 that has λ_{max} (nm) of band I, 325nm and band II, 289nm exhibitd the strongest activity on antioxidation. ES-R5 fraction showed similar pattern to flavones by the analysis of UV-VIS spectral data.

Key words - *Stachys Sieboldii* MIQ. roots, antioxidant activity, flavones

활성 산소는 활성이 강한 산소 종으로 에너지 대사를 위해 산소를 이용하는 많은 생명체에서 발생하는 산소 부산물이다. 이러한 활성 산소 종으로는 초과산화물(superoxide), 초과산화 음이온(superoxide anion), 과산화 수소 또는 수산화 라디칼 등이 있다. 산소는 인간을 포함한 호기성 생물의 생존에 필요 불가결한 요소이지만, 부산물로 생성되어진 활성산소종은 매우 큰 반응성을 나타내어 자유 라디칼 형태로 개시, 증식, 그리고 종결의 과정을 거쳐 세포를 손상시켜 노화에 영향[1]을 미치거나 면역 작용[13]을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 인간은 흡입하는 산소 중 약 1~3%를 초과산화물(superoxide)을 만드는데 인간이 사용하는 산소량을 계산하면 매년 2 kg의 초과산화물이 체내에서 만들어지는 것이다[12].

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 과산화 수소, 그리고 OH 라디칼 등의 독성을 해소 또는 약화시킴으로써 그 기능을 나타낸다. 다른 한편으로는 황록색 야채의 다양한 항산화 물질이 섭취를 통해 체내에서 활성 산소종을 소거하거나 발생을 억제시키거나, 생성물로서의 연쇄반응을 차단하는 역할을 한다. 이러한 현상은 식물체 내의 2차 대사 산물이 생체에 대한 활성을 나타내고 있기 때문이며 그러한 물질 중 가장 광범위하게 분포되어 있는 것이 polyphenols이다. polyphenols이란 한 분자내에 2개

이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물들을 지칭하며 flavonoids, lignans, lignins 그리고 tanin등이 여기에 속한다. 이러한 polyphenolic 화합물은 식물체에 다량으로 존재하며 생체 내에서 노화 방지와 항산화, 항암, 항바이러스, 및 항염 같은 활성을 나타내는 것으로 보고 되어져 있다 [6,2].

본 연구에 사용된 초석잠(*Stachys sieboldii* MIQ.)은 labiate 과로 중국의 전통적인 건강채소로서 Chinese artichoke, Japanese artichoke, crosne, knotroot [7]로 불리며 중국, 일본 및 러시아등에서 주로 재배되고 있다. 1년생 본초로 줄기는 직립이며, 잎은 장 타원형에, 꽃은 8월 하순에 담홍색으로 이삭 모양의 작은 꽃을 개화한다. 뿌리는 가을에 지하에서 3~6 cm 정도로 자라는데 형태가 동충하초와 비슷하고 약효도 비슷하여 식물의 동충하초라 불리운다. 일본에서는 정월 요리에 귀하게 사용되기도 하며, 중국의 중약편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매, 또는 장을 강화하는 장수채로 알려져 있으며, 연구에 의하면 항 산소 결핍 활성[18], hyarulonidase 억제 활성[16] 또는 면역 거부 활성[14] 등이 있음이 알려져 있다.

기존의 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxy anisol), BHT(butylated hydroxy toluene)등은 다량 투여시 기형이 발생되거나 암이 발생할 가능성이 있다고 보고 되었으며[4], α -tocopherol은 효능이 우수하나 가격이 비싼 단점이 있어, 본 연구에서는 초석잠에서 polyphenolic 화합물이 제일 많이 함유된 뿌리의 항산화 활성도를 밝혀 항산화성 식품소재로서의 이용 가능성에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-3082, Fax : +82-51-512-8563

E-mail : p3707@hanmail.net

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 초석잠은 경남 밀양시 산외면 야산에서 직접 채취한 것이다. 겨울에 채취한 초석잠 뿌리를 바람이 잘 통하는 그늘에서 10일간 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 분광 광도계(Perkin Elmer, Germany)를 사용하였다.

시료의 추출

분쇄된 뿌리 건조물을 Fig. 1과 같은 계통으로 분획 추출하

였다. 696.9 g의 뿌리 분쇄 건조물을 메탄올 4 L로 12시간씩 3회 추출하고 GF/C (47 mm ϕ , Whatman)로 감압 여과 시킨 후 회전식 감압 증류 장치로 농축시켰다. 농축물을 300 mL의 3차 증류수에 녹인 후 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올순으로 1:1의 비율로 혼합한 후 분액 여두를 사용하여 3시간씩 3회 반복 분획하였다. 각각의 분획물을 농축하여 시료 건물량에 대한 백분율로 추출 수율을 계산하였다.

Total polyphenols과 flavonoids 함량 측정

초석잠 뿌리의 total polyphenols 함량을 Folin-Denis법[15]으로 측정하였다. 메탄올 추출물(99%메탄올 1 mL에 추출물 500 μ g을 용해)용액 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL을 섞어 3분간 실온에서 방치한 후, Na_2CO_3 포화용액 0.2 mL을 가하여 잘 섞고 증류수로 2 mL가 되게 첨가하여 실온에서 1시간 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 μ g/mL이 되도록 하여 작성한 검량선으로 측정된 흡광도를 농도로 환산하였다.

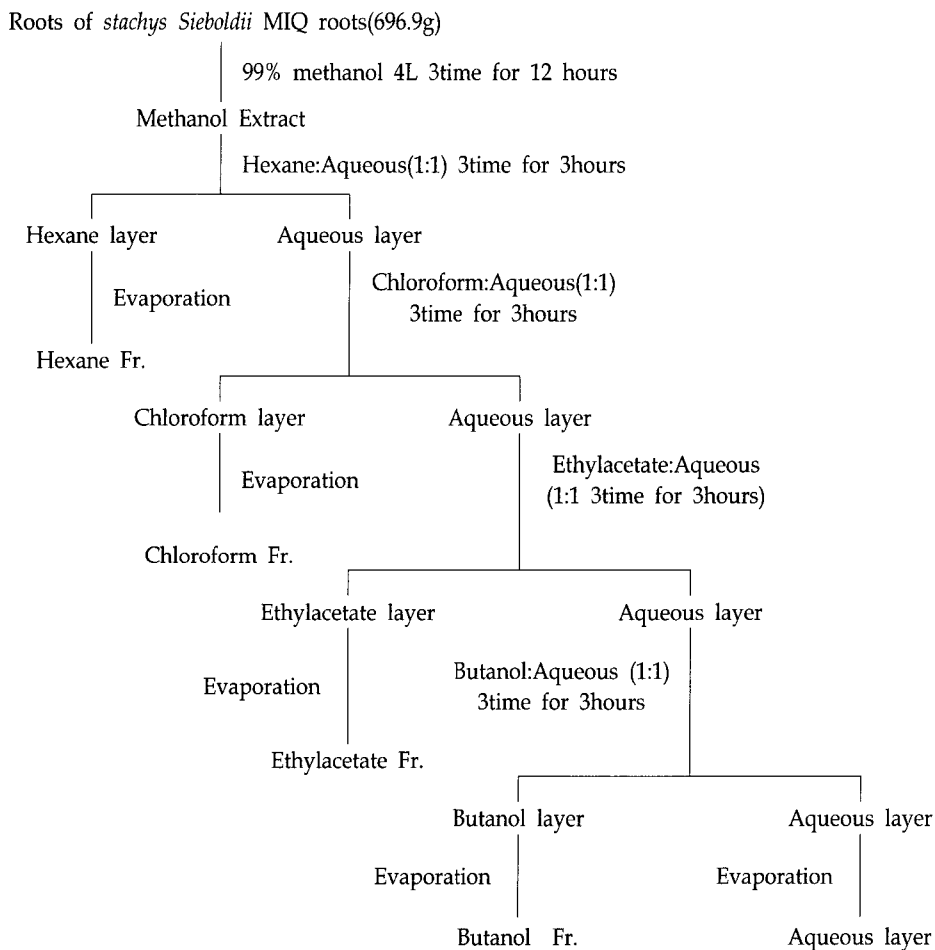


Fig. 1. Flow chart for solvent fractionation of *Stachys sieboldii* MIQ. roots.

Total flavonoids 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 측정하여 환산하였다[10]. 이 때 Rutin의 농도가 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL이 되도록 하여 작성한 검량 선으로 농도를 산출하였다.

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[3]. 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 30 분간 실온에서 방치 한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화 지질 형성 억제능 측정

과산화지질 형성 억제능 측정에는 linoleic acid를 자동산화 모델로 하여 측정하였다[17]. 시험액 조제를 위해 20 mL 유리 병에 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/mL농도로 희석한 추출물을 30 µL씩 첨가하였다. 자동 산화를 진행시키기 위해 시험액을 차광시킨 38~40°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 3분 동안 반응시키고 3.5% 염산용액에 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[8]의 방법으로 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 각 시료(증류수 1mL에 추출물 1 mg을 용해)를 1mL씩 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 반응시킨 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 추

출물을 실리카겔 칼럼(직경: 3 cm, 길이: 67 cm, 입자크기: 63~200 µm)을 사용하여 분리하였다. 용출 용매로는 클로르포름: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 6개의 분획으로 나누었으며, 용출 용매를 제거 하기 위해 회전식 감압 증류 장치를 이용하였다. 각각의 분획은 DPPH방법을 이용해 항산화 활성도가 측정되고, UV/VIS 분광 광도계로 흡광도 파악이 측정되었다.

박층 크로마토그래피

박층 크로마토그래피는 칼럼 크로마토그래피의 분획을 6개의 분획으로 분류하기 위해 사용되었다. 전개 상으로는 클로르포름:메탄올:증류수(70:30:5)의 하층이 사용되었으며 UV light 검출기와 10% H₂SO₄에 1%의 Ce (SO₄)를 녹인 발색제가 사용되어 Rf값이 구해졌다.

결과 및 고찰

초석잠의 메탄올 추출물에서 total polyphenols과 flavonoids의 함량을 측정하여 Table 1에 나타내었으며, 활성 성분 에 대한 특성을 검토하고자 극성이 다른 유기 용매인 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올순으로 순차적으로 추출물을 용출하여 얻은 수율을 Fig. 2에 나타내었다.

건조시켜 가루 상태의 초석잠 뿌리(*Stachys sieboldii* MIQ.) 696.6 g을 메탄올로 추출하여 86.37 g (12.4%)의 추출물을 얻었으며 이 중 86.37 g을 취하여 헥산 추출물에서 2.86 g (3.31%), 클로르포름, 3.27 g (3.79%), 에틸아세테이트, 1.23 g (1.42%),

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

	polyphenols	flavonoids
Contain volume (%)	3.02	1.97

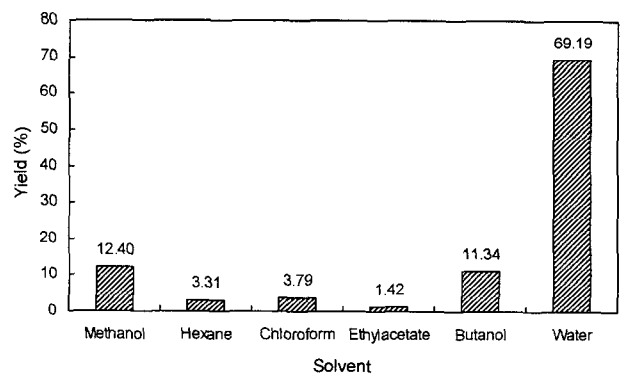


Fig. 2. Relative amounts of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MIQ. roots.

부탄올, 9.79 g (11.34%), 증류수, 59.77 g (69.19%)의 추출물을 각각 얻었다. 그 중 에틸아세테이트의 추출물에서 높은 항산화 활성도를 보여 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 다시 분획하였다.

DPPH에 의한 항산화 활성도 측정

각 용매별로 추출한 시료의 DPPH에 의한 자유 라디칼 소거작용을 측정하여 라디칼의 50%를 소거시키는 농도 값을 IC50으로 표시하였으며 Fig. 3에 각 추출 시료의 비교 값을 나타내었다. 증류수가 200 µg으로 가장 낮은 값을 보였고 헥산(100 µg), 클로르포름(80 µg), 메탄올(25 µg), 부탄올(10 µg), 에틸 아세테이트(2.8 µg)의 순으로 높은 소거능을 보이고 있다. 특히 에틸 아세테이트와 부탄올 추출물은 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA (20.6 µg), BHT (100 µg), α-tocopherol (21.8 µg)에 비해 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 불활성화 시키고 호르몬 생 합성을 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. 각 분획별 초석잠 추출물을 이용하여 이러한 과산화 지질(linoleic acid)에 대한 형성 억제능을 측정하고 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Control이 2일부터 급격한 산화를 보이고 있지만 용매 추출물들은 3일 동안 흡광도가 0.1~0.2 사이로 큰 변화를 나타내지 않았다. 하지만 4일부터 증류수, 메탄올, 헥산, 클로르포름 순으로 급격한 흡광도의 변화를 보이며 산화가 되어감을 보였다. 에틸아세테이트와 부탄올은 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA, BHT, α-tocopherol와 비슷하게 9일 동안 흡광도의 변화를 보이지 않으면서

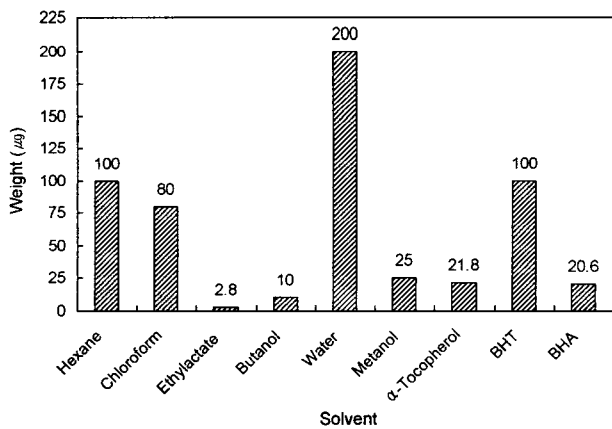


Fig. 3. Antioxidant activity of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MIQ. roots by DPPH method.

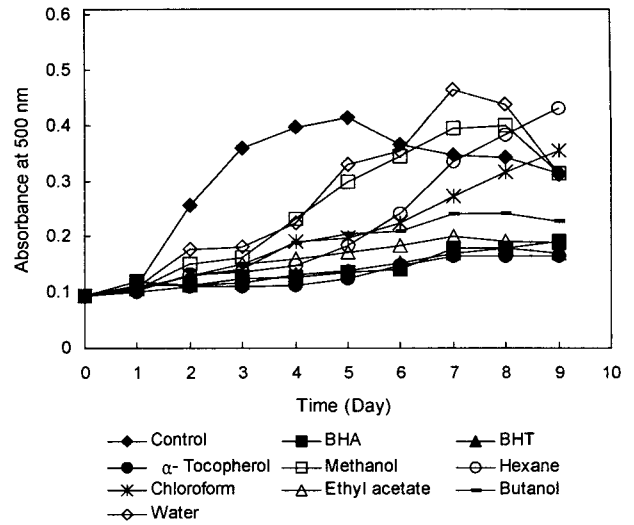


Fig. 4. Antioxidant activity of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MIQ. roots on the oxidation of linoleic acid by ferric thiocyanate method.

지속적인 과산화 지질 형성 억제능을 보여 주고 있었다.

아질산염 소거능 측정

아질산염은 육제품의 발색과 *Clostridium botulinum* 성장저해제로 각종 식품에 첨가되고 있다. 질산염은 식물체내, 소화기관 및 식품의 저장과정에서 질산환원효소, 환원세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 질산염이 많이 함유된 식품을 다량 섭취하게 되면 methemoglobin증 등의 중독증상과 아질산염과 제2급 및 3급 아민과의 nitroso화 반응이 위장내의 낮은 산성조건에서 쉽게 일어나서 발암물질인 nitrosamine을 생성할 수도 있다[9]. 아질산염의 nitrosamine화 반응이 인체와 유사한 pH에서 최적 조건을 가지므로, pH 1.2, 3.03, 5.97에서 각 추출물의 아질산염의 분해작용을 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH가 낮을수록 높은 소거능을 보였으며

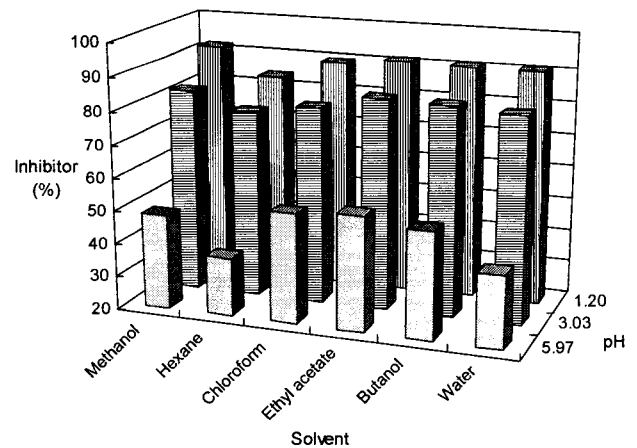


Fig. 5. Nitrite scavenging ability of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* MiQ. roots.

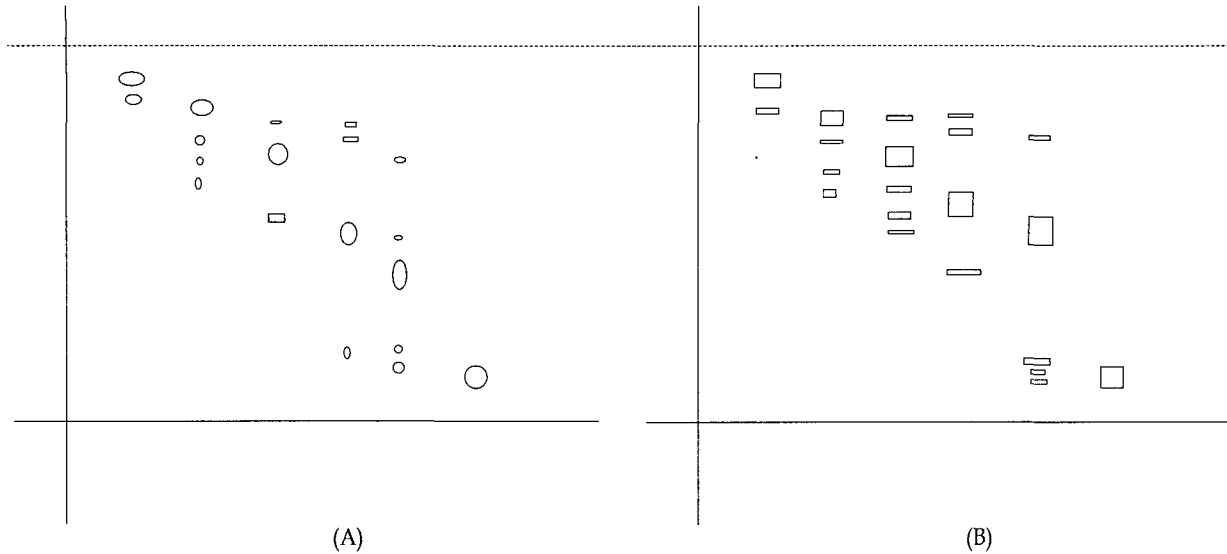


Fig. 6. TLC of the fraction separated from the silica gel column chromatography of the ethylacetate extract from *Stachys sieboldii* MiQ. roots (A) under 1%Ce(SO₄)/10%H₂SO₄; (B) under UV light 254 nm.

특히 pH 1.2에서는 모든 추출물군에서 80~90% 이상의 분해능을 보이고 있다. pH 3.03 과 pH 5.97에서는 에틸아세테이트 추출물이 각각 83.86%, 54.35%를 나타내며 다른 추출물에 비해 우수한 소거능을 보이고 있다.

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 Rf로 분석하는 장치이다. 실리카겔 칼럼을 이용해 1 mL/min 속도로 용출시킨 에틸아세테이트의 추출물을 박층 크로마토그래피를 이용해 64개의 fraction을 같은 Rf값을 가지고 있는 6개의 분획으로 나누었고 이를 각각 ES-R1 (1~3), ES-R2 (4~6), ES-R3 (7~14), ES-R4 (15~28), ES-R5 (29~36), ES-R6 (37~65)로 명명하였다. 분리되어진 띠의 확인은 UV 254 nm 와 1% Ce (SO₄)/10%H₂SO₄를 이용하였으며 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 각 분획물을 감압 증류하여 ES-R1에서는 하얀 분말을, ES-R2에서는 노란 분말을 ES-R3, ES-R4에서는 연두색 분말을 ES-R5, ES-R6에서는 갈색 분말을 얻었다. 각 띠는 높은 Rf에서 낮은 Rf으로 이동되며 이것은 비극성에서 극성으로 옮겨가는 것을 의미한다.

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 좋은 항산화 활성도를 나타냄을 알 수 있으므로, 다시 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분획 하였다. 각 분획

별 흡광도의 변화를 Fig. 7에 나타내었으며 최대 흡광도값을 Table 2에 나타내었으며 칼럼 분획물은 280~330 nm 사이에서 높은 흡광도를 나타내고 있다. 각 분획을 DPPH법을 이용해 항산화 활성도를 측정하여 Fig. 8에 나타내었으며, 325 nm 및 289 nm에서 최대흡광도 값을 가지는 값인 ES-5가 가장 높은 활성도를 나타내었다. 이러한 모양은 phenolic acids 과 flavonoids의 UV-VIS spectral 값인 200~400 nm 사이와 일치하며[2] 특히 flavonoids 계열 중 flavones의 최대 흡광범위로 알려져 있는 띠 I 이300~330nm, 띠 II가275~295nm와 일치하는 범위를 나타내고 있다[11]. 이러한 범위는 초석잠(*Stachys*

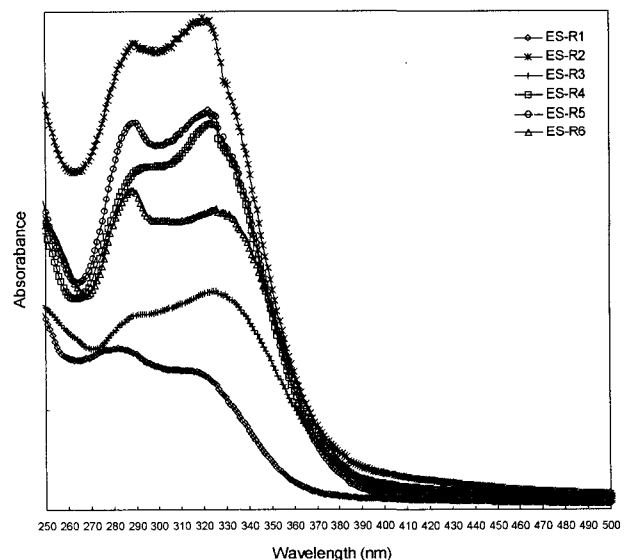


Fig. 7. UV/VIS spectral scan for the fractions of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MiQ. roots by silica gel column chromatography.

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

fraction	$\lambda_{max}(nm)$
ES-R1	284, 315
ES-R2	317, 284
ES-R3	326, 287
ES-R4	322, 296
ES-R5	325, 289
ES-R6	289, 330

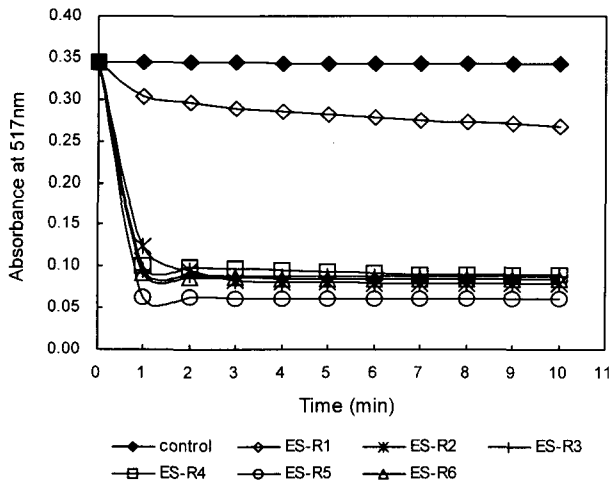


Fig. 8. Antioxidant activity of the isolated fraction of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MIQ. roots by DPPH method.

sieboldii MIQ.)에서 항산화 활성도가 높은 부분만을 취해 분획하여 나타난 UV- VIS spectral data의 범위와 같으므로 본 연구의 추출물 중에도 여러 phenolic compounds가 존재함을 추정할 수 있으며, 보다 정확한 구조는 차후 실험에서 C-NMR, H-NMR, IR등을 이용해 밝힐 예정이다.

요 약

약용 식물로서 그 효능이 알려져 있으나 다른 약용 작물에 비해 성분 연구가 알려져 있지 않은 초석잠에 대한 항산화 활성도에 시험하였다. 뿌리의 메탄올 추출물 100 mg을 메탄올 20 mL에 녹여 만든 샘플에서 total polyphenols과 flavonoids가 각각 14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.02%), 9.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.97%)씩 함유되어 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 비교해서 에틸아세테이트(2.8 μg), 부탄올(10 μg) 추출물이 보다 우수한 항산화능을 보였다. 과산화 지질 형성 억제능과 아질산염 소거능 조사에서는 에틸아세테이트의 추출물이 다른 용매 분획물과 비하여 가장 높은 활성도를 나타내었으며 기존

의 항산화제들과 비슷한 효능을 나타내었다. 이를 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용해 다시 분획하여 6개의 분획을 얻었으며 UV/VIS 흡광광도계를 통해 최대 흡광도의 파장은 280~330 nm사이에 있음을 확인하였다. 그 중 최대 흡광도가 띠 I 이 325 nm, 띠 II가 289 nm 인 ES-R5에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 이는 일반적으로 알려져 있는 phenolic compounds의 UV-VIS spectral data와 일치하며 특히 flavones의 UV- VIS spectral data와 유사한 경향을 보이고 있으므로 flavones 계통의 phenolic compounds가 초석잠(*stachys sieboldii* MIQ)속에 함유되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

1. Beckman, K. B. and B. N. Ames. 1998. The free radical theory of ageing matures. *Physiological Reviews*. **78**, 547-581
2. Benavente-Garcisa, O., J. Castillo, Marrin, F. R. Ortuno and A. Rio. 1997. Uses and properties of citurs flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4505-4515.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
4. Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole anbutylated hydroxyanisole anbutylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59.
5. Cuvelier, M. E., H. Richard and C. Berset. 1996. Antioxidative activity and phenolic comparsition of pilot-plant and commercial extract of sage and rosmary *JACOS* **73**, 645-652.
6. Hertog, M. G. L. and P. C. H. Hollmam. 1996. Potential health effects of the dietary flavonid quercetin, *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, 63-66.
7. International Society for Horticultural Science. 1990. Elsevier's dictionary of horticultural and agricultural plant production, pp 72, 20rd eds., Elsevier Science Publication. Netherlands.
8. 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.
9. Kim, D. K. 1999. Studies on the analysis of antioxidative compounds extractd from Korean *Rhus verniceflua* STOKES and their biological activities. pp. 77, M.S. Thesis, Dept. of Gemetic Engineering, Soon Chun Hyang University, Chung-Nam.
10. Lee, Y. C., K. H. Hwang and D. H. Han. 1997. Composition of *Opuntia ficus-india*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 847-853.
11. Markham, K. R. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. pp. 36, 1th eds., Aca-demic Press, New York.
12. Luc, M., M. Emile, and J. C. Hubaud. 2000. Spectro-

- photometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta.* **411**, 209-216.
13. Pick, J. and Chandra, R. k. 1995. Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in health elderly. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **65**, 117-120.
 14. Sasaki, H., H. Nishimura and T. Morita. 1989. Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*. *Plant Med.* **55**, 485-462.
 15. Swain, T. and W. E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* (L) quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **10**, 63- 68.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.