

토복령의 항산화 활성

차배천* · 이은희 · 노미애

상지대학교 생명자원과학대학 바이오산업공학과

Antioxidant Activity of *Smilacis Chinae Radix*

Bae Cheon Cha*, Eun Hee Lee, and Mi Ae Noh

Department of Bio-Industry and Technology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – *Smilacis Chinae Radix* is root of *Smilax china* L.. It has been known as a Korean folk medicine for anti-inflammatory, anti-microbial diuresis, detoxification and relieving enteropathy as diarrhea. Reactive oxygen species(ROS) are continuously produced at a high rate as a by-product obtained in the aerobic metabolism. A major portion of living organisms has defense system as superoxide dismutase or catalase against damage produced by ROS. Several lines of evidence provided that ROS appears to cause to develop aging and various diseases. In this study, we have investigated the antioxidant activities of *Smilacis Chinae Radix* in order to screen the antioxidant substances from natural products. As a result, EtOAc extract of *Smilacis Chinae Radix* exhibited potent antioxidant effect on various antioxidant experiment. The major components of antioxidant activity were isolated from EtOAc extract of *Smilacis Chinae Radix*. Their structure of compounds were identified as quercetin and (-)-epicatechin by spectroscopic evidence, respectively.

Key words – *Smilacis Chinae Radix*, *Smilax china* L., reactive oxygen species(ROS), antioxidant, quercetin, (-)-epicatechin

토복령은 우리나라 전국 산야지에 분포하는 청미래덩굴(*Smilax China* L., Liliaceae)의 근경을 지칭하는 생약이다. 청미래 덩굴은 한국을 비롯하여 중국, 일본에 널리 분포하며 백합과의 덩굴성 낙엽관목으로서 명감나무 또는 망개나무라고 불리며 약명으로는 토복령(土茯苓)이라고도 지칭한다. 꽃의 개화기는 5-6월이며 9-10월에 적색의 열매를 맺고, 근경은 옆으로 뻗고 갈색이다. 잎은 호생하고 두껍고 넓은 타원형이며 끝이 뾰족해 지고 밑은 둥글고 가장자리가 밋밋하여 기부에서 5-7개의 맥이 나오고 다시 그물맥이 된다.¹⁻³⁾ 한방과 민간에서는 토복령을 해독, 임질, 소화, 하리, 이뇨 등의 약재로 사용하고 있으며,^{3,4)} 토복령의 성분에 관한 연구로는 많이 이루어지지 않았으나 spirostane 배당체와 furostane 배당체로서 6종의 steroid계 saponin이 분리 보고되었다.⁵⁾ 이 중 dioscin의 항돌연변이원성작용, 항암작용, PLA₂ 저해작용 등의 생리활성이 보고 되어져 있다.³⁾

인체는 생명유지에 필요한 에너지를 만들기 위해 끊임없이 산소를 필요로 하며 에너지를 만드는 과정에서 필수불가결한 분자이지만 호흡과정에서 흡입한 산소 중 일부(약

2-3%)은 활성산소라는 유독 작용을 하는 물질로 전환되어 생체에 큰 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 이러한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 체내 효소계, 환원대사, 물리적 또는 환경적 요인 등에 의해 끊임없이 생성되고 있는 일중항산소(¹O₂)나 superoxide(O₂·⁻), hydroxy radical(·OH)과 같은 짝짓지 않은 상태의 free radical과 과산화수소(H₂O₂) 등으로서 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포성분들을 공격하기 쉽게 되어 산화적 스트레스의 환경이 조성 된다.⁷⁾ 이들 활성산소는 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 질환을 일으키며,⁸⁾ 특히 문제가 되는 것은 활성산소종이 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내과산화 지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되고 동시에 노화 및 류마티스성 관절염, 심장병, 파킨슨씨병, 순환기장애, 간장질환, 암 등과 같은 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾

최근에 성인병 질환과 노화의 원인이 활성산소종에 기인된 것이라는 학설이 인정됨에 따라 산소로부터 유래된 활성산소종을 조절하거나 제거할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 많은 항산화제의 개발 연구가 보고 되어져 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 그러나 이들 항산화제 중

*교신저자(E-mail) : bccha@sangji.ac.kr
(FAX) : 033-730-0503

tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, BHA와 BHT 등의 합성 항산화제는 항산화력이 뛰어나 산업용 식품 및 의약품 등에 가장 많이 이용되고 있는 페놀계 항산화제이나 이들은 변이원성 및 독성의 유해성이 지적되고 있어^{15,16)} 사용이 점차 감소하고 있는 추세이다. 따라서 오래 전부터 인간이 안전하게 먹어왔던 식품 자원인 천연물질이나 약용식물로부터 항산화 물질을 분리하여 합성 항산화제를 대체할 수 있는 항산화력이 우수한 새로운 천연 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁷⁻²⁰⁾

본 연구는 기존에 연구 개발되어진 천연 항산화제보다 안전하고 우수한 활성을 나타내는 항산화제를 천연물로부터 개발하기 위한 연구의 일환으로 토복령에 대하여 free radical 소거효과는 DPPH법을, 지질 과산화 억제효과는 Ferric-Thiocyanate법 및 Rancimat법을 이용하여 항산화 효과를 검토하였고, 활성 주성분을 규명하였으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 토복령은 강원도 원주시 소재 약업사에서 구입하여 음건하고 세절하여 실험 재료로 사용하였으며, 표본은 상지대학교 바이오산업공학과 응용천연물표본실에 보관중이다.

시약 및 기기 - 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (ART.5715, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 시약을 사용하였다. Free radical 소거효과 측정용 시약인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며 지질과산화 억제 효과 측정용 시약인 ammonium thiocyanate, Tween 20, HCl 및 EtOH 등은 모두 특급시약을 사용하였고, 식용유지(soybean, corn, palm, lard)는 첨가제가 첨가되지 않은 식용유지를 사용하여 측정하였다. 표준품인 tocopherol 및 BHA(butylated hydroxyanisole)는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였고, 기타 용매는 1급 시약을 사용하여 실험하였다. 흡광도는 Milton-Roy spectronic Genesys-5 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, FT-NMR은 Varian Mercury 300 MHz를 사용하였고, 용점은 Mettler FP-5 용점측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. 산화 안정도 측정기기로서는 Rancimat 679 METROHM을 사용하여 측정하였다.

추출 및 분리 - 음건한 토복령 600 g을 MeOH 500 ml를 가하여 수욕상에서 5시간씩 3회 환류 추출하여 여과 후 농축하여 토복령 MeOH ext.(32 g)를 얻었다. 얻어진 MeOH ext.를 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH 순으로 분획 후 농축하여 각 분획물 *n*-hexane ext.(1.7 g), EtOAc

ext.(3.8 g), *n*-BuOH ext.(2.0 g) 및 H₂O ext.(23.0 g)를 각각 얻었다. 분획물 중 가장 우수한 항산화 효과를 나타낸 EtOAc 분획물을 *n*-hexane → Acetone으로 단계적으로 극성을 높인 전개용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획인 fraction 1(48 mg), fraction 2(117 mg), fraction 3(85 mg), fraction 4(168 mg) 및 fraction 5(1146 mg)로 나누었다. 항산화 효과를 나타낸 fraction 3과 fraction 4로부터 활성 주성분을 규명하기 위해 계속하여 *n*-hexane → Acetone으로 단계적으로 극성을 높인 전개용매를 이용하여 silica gel column chromatography로 정제하여 fraction 3으로부터는 화합물 **1**을 분리하였고, fraction 4로부터는 화합물 **2**를 얻었다.

화합물 1 - Light yellow powder (EtOH); m.p. : 313-314°C; UV λ_{\max} : 267, 371 (MeOH); IR(KBr)cm⁻¹ : 3380 (OH), 1676 (C=O), 1608, 1516, 1235 (aromatic C-O); ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 6.19 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.40 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.89 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 7.64 (1H, dd, *J*=2.3, 8.5 Hz, H-6'), 7.74 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 176.1 (C-4), 164.4 (C-7), 161.3 (C-5), 157.0 (C-9), 147.6 (C-2), 146.7 (C-4'), 145.0 (C-3'), 136.0 (C-3), 122.9 (C-1'), 120.4 (C-6'), 115.0 (C-5'), 114.8 (C-2'), 103.3 (C-10), 98.0 (C-6), 93.2 (C-8); EI-MS *m/z* 302 [M]⁺

화합물 2 - Light yellow powder (EtOH); m.p. : 234-236°C; UV λ_{\max} : 234, 281 (MeOH); IR(KBr)cm⁻¹ : 3450 (OH), 1467 (aromatic C=C); ¹H-NMR (Acetone-*d*₆) δ : 2.54 (2H, m, H-4), 4.05 (1H, t-like, *J*=3 Hz, H-3), 4.75 (1H, br. s, H-2), 5.73 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-6), 5.92 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-8), 6.67 (2H, br. s, H-5',6'), 6.91 (1H, br. s, H-2'); ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆) δ : 157.0 (C-9), 156.9 (C-5), 156.5 (C-7), 144.7 (C-3'), 144.6 (C-4'), 131.6 (C-1'), 118.7 (C-6'), 114.8 (C-5'), 114.6 (C-2'), 99.1 (C-10), 95.5 (C-6), 95.0 (C-8), 78.8 (C-2), 66.3 (C-3), 28.3 (C-4); EI-MS *m/z* 290 [M]⁺

토복령 분획물 및 항산화 활성 주성분의 DPPH 라디칼 소거작용의 측정 - Uchiyama 등²¹⁾의 방법을 약간 변형시킨 Yoshikawa 등²²⁾의 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M의 초산 완충액(pH 5.5, 2.0 ml)에 시료의 EtOH 용액(2.0 ml) 및 2 × 10⁻⁴ M DPPH EtOH 용액(1.0 ml)을 가하여 전량을 5 ml로 하고 실온에 방치한 후, 30분 후 517 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(μ g)을 tocopherol 및 BHA와 같은 기존의 항산화제를 대조군으로 하여 시험하였다.

토복령 분획물의 Ferric-Thiocyanate법에 의한 지질 과산화 억제활성 측정 - Ferric-Thiocyanate법은 Inatani 등²³⁾

의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료의 EtOH 용액(2.0 ml), linoleic acid EtOH 용액[linoleic acid(2.51 g)의 EtOH(100 ml)용액](2.0 ml), 0.05 M 인산완충액(pH 7.0, 4.0 ml), 증류수(1.9 ml) 및 10% Tween 20(0.1 ml)을 20 ml의 시험관에 시료의 최종농도가 0.005%가 되도록 전량을 10 ml로 하여 40°C의 암소에 방치하였다. 이 시료 0.1 ml에 75% EtOH(9.7 ml) 및 30% ammonium thiocyanate(0.1 ml)를 가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 2×10^{-2} M 염화제일철의 3.5% 염산용액(0.1 ml)을 가하고, 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

토복령 분획물 및 항산화 활성 주성분의 Rancimat법에 의한 지질 과산화 억제 활성 측정 - Rancimat법은 Chen 등²⁴⁾과 Lim 등²⁵⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료와 유지 혼합물 2.5 g, 증류수 70 ml, flow rate 20 L/hr, 반응온도 120°C로 하여 산화 안정성을 비교하였다. Antioxidant index(AI)는 각 시료를 첨가한 실험군의 유도기간을 무첨가군의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다. 이때 시료의 첨가량은 각각 200, 400 및 600 ppm로 하여 3회 반복 측정하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 널리 사용되고 있는 합성 항산화제인 BHA와 BHT는 그 효과와 경제성 면에서 많이 사용해 왔지만 합성 식품 첨가물의 일반적인 회피 현상뿐만 아니라 과량 섭취 시에는 간, 위장점막, 폐, 순환계 등에 심각한 독성 작용을

Table I. Radical scavenging effect of the extracts from *Smilaxis Chinae Radix* on DPPH method

Samples	50% reduction(μg) ^a
α -Tocopherol	22
BHA	15
MeOH ext.	22
n-Hexane ext.	25
EtOAc ext.	19
n-BuOH ext.	20
H ₂ O ext.	63

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} ml, 0.079 mg) solution.

일으키는 것으로 알려져²⁶⁾ 안전한 대체 항산화제의 개발이 요구되어 인체에 무해하고 항산화력이 우수한 천연 항산화제의 개발을 위하여 토복령에 대한 항산화 효과를 연구하였다. 기존에 널리 알려진 천연 항산화제인 α -tocopherol과 합성 항산화제인 BHA를 대조군으로 하여 토복령 분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용시험을 실시한 결과, Table I에 나타난 바와 같이 토복령의 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물에서 BHA와 유사한 강력한 free radical 소거효과를 나타내었다. 계속하여 보다 상세한 항산화 효과 시험을 위해 불포화지방산인 linoleic acid를 이용하여 불포화지방산의 과산화 정도를 장기보관에 따른 억제율로 항산화 활성을 측정하는 Ferric-Thiocyanate법에 의한 지질 과산화 억제 시험 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 Control 군이

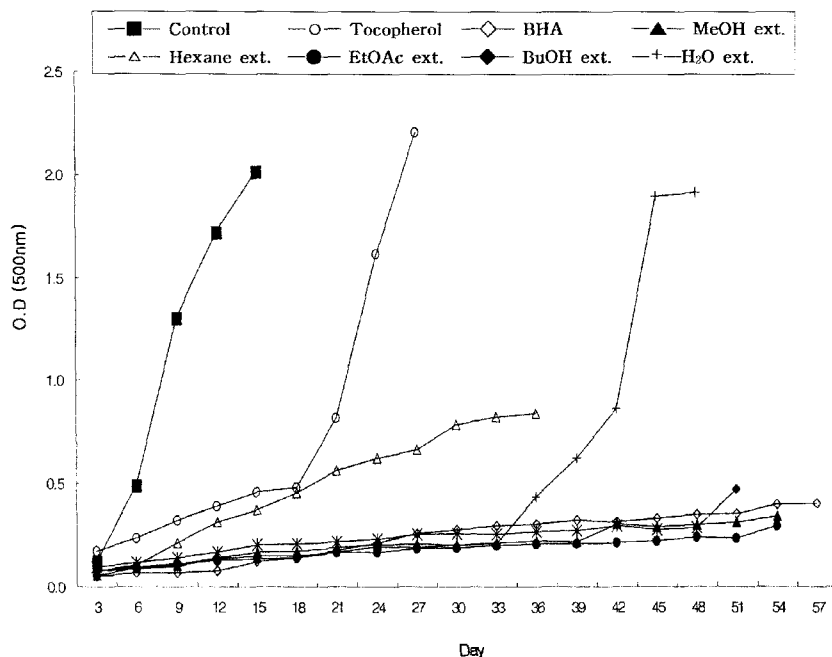


Fig. 1. Lipid peroxidation inhibitory effect of the extracts from *Smilaxis Chinae Radix* on Ferric-Thiocyanate method.

Table II. Lipid peroxidation inhibitory effect of the extracts from *Smilacis Chinae Radix* on Rancimat method¹⁾

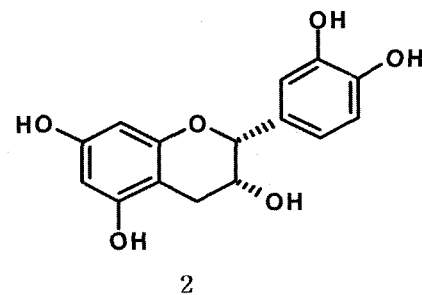
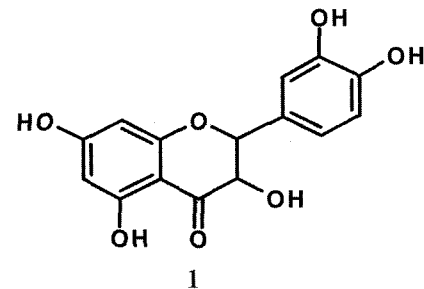
Samples	Soybean oil(ppm)			Corn oil(ppm)			Lard oil(ppm)			Palm oil(ppm)		
	200	400	600	200	400	600	200	400	600	200	400	600
α -Tocopherol	1.025	1.007	1.042	1.017	1.025	1.012	1.085	2.222	2.299	1.008	1.150	1.198
BHA	1.380	0.873	0.990	1.086	1.050	1.033	2.147	2.679	3.554	1.079	1.233	1.214
MeOH ext.	0.942	1.078	1.097	1.057	1.150	1.188	0.984	1.294	1.213	1.077	1.083	0.959
<i>n</i> -Hexane ext.	0.960	0.982	1.002	1.013	1.047	1.066	1.051	1.021	1.028	1.023	1.009	1.012
EtOAc ext.	1.050	1.079	1.034	1.005	1.081	1.120	1.051	1.275	1.489	1.142	1.125	1.144
BuOH ext.	1.081	0.969	1.007	1.047	1.041	1.017	1.126	1.285	1.283	0.917	1.066	1.070
H ₂ O ext.	1.080	1.021	0.993	1.035	1.063	0.992	1.126	1.265	1.131	1.096	1.093	1.091

¹⁾Antioxidative index (AI, induction time of oil containing of each extract/induction time of test oil)

거의 과산화가 일어남에 비하여 합성 항산화제인 BHA를 첨가한 군은 57일 만에 과산화가 일어났으며, 토복령의 *n*-hexane과 H₂O 분획물을 첨가한 군은 36일 이상, 토복령의 MeOH, EtOAc 및 BuOH 분획물을 첨가한 군에서는 51일 이상에서 과산화가 일어났다. 이들 중 토복령의 EtOAc 분획물은 54일 이상을 유지함으로써 천연 항산화제인 α -tocopherol 보다는 월등히 우수하고, 합성 항산화제인 BHA와는 유사한 강력한 지질 과산화 억제 효과를 보였다. Rancimat 법에 의한 지질 산패 억제실험 결과 또한 Table II에 나타난 것과 같이 토복령의 EtOAc 분획물이 4종의 식용유지 (soybean, corn, lard, palm oil)에서 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA 보다는 약간 우수한 지질 산패 억제 효과를 보였다.

이상의 항산화 실험 결과, 우수한 효과를 나타낸 EtOAc 분획물에 대하여 활성 주성분을 분리하기 위하여 소분획하여 얻어진 5종의 소분획물에 대해서 DPPH법에 의한 free radical 소거 작용을 실시한 결과, Table III에 나타난 것과 같이 fraction 4의 소분획물은 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA보다 다소 미흡하나 fraction 3의 소분획물은 BHA와 동일한 우수한 효과를 나타내었다. 우수한 효과를 나타낸 fraction 3과 fraction 4 소분획물을 재차 silica gel column

chromatography에 의해 분리·정제하여 fraction 3으로부터 화합물 1을 fraction 4로부터 화합물 2를 얻었다. 얻어진 화합물 1과 2는 미황색 분말로 FeCl₃ 시험에서 녹색을, 아니스알데히드-황산시액에서 오렌지색을 나타내어 flavan계 물

**Fig. 2.** Structure of compound 1 and compound 2 isolated from EtOAc ext. of *Smilacis Chinae Radix*.**Table III.** Radical scavenging effect of prepared fractions from EtOAc ext. of *Smilacis Chinae Radix* on DPPH method

Samples	50% reduction(μ g) ^a
α -Tocopherol	22
BHA	15
Fraction 1	52
Fraction 2	32
Fraction 3	15
Fraction 4	18
Fraction 5	29

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} ml, 0.079 mg) solution.

Table IV. Radical scavenging effect of quercetin and (-)-epicatechin isolated from *Smilacis Chinae Radix* on DPPH method

Samples	50% reduction(μ g) ^a
α -Tocopherol	22
BHA	15
Quercetin	16
(-)-Epicatechin	17

^aAmount required for 50% reduction of DPPH(2×10^{-7} ml, 0.079 mg) solution.

Table V. Lipid peroxidation inhibitory effect of quercetin and (-)-epicatechin isolated from *Smilacis Chinae Radix* on Rancimat method¹⁾

Samples	Soybean oil(ppm)			Corn oil(ppm)			Lard oil(ppm)			Palm oil(ppm)		
	200	400	600	200	400	600	200	400	600	200	400	600
α -Tocopherol	0.975	0.983	1.013	0.930	0.998	0.981	1.215	1.368	1.414	0.943	0.987	0.917
BHA	1.011	1.091	1.111	1.028	1.137	1.013	1.847	2.204	2.333	1.107	1.233	1.214
Quercetin	1.292	1.545	1.412	1.124	1.307	1.352	1.142	1.928	2.419	1.537	1.513	2.900
(-)-Epicatechin	1.513	1.459	1.280	1.244	1.226	1.362	3.194	4.229	5.636	1.242	1.208	2.022

¹⁾Antioxidative index (AI, induction time of oil containing of each extract/induction time of test oil)

질로 추정되었고, IR에서 수산기가 확인되고 UV에서 벤젠환의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 TLC 및 HPLC 분석에서 표준품과 비교 분석한 결과 화합물 1은 quercetin, 화합물 2는 (-)-epicatechin임을 추정할 수 있었다. 최종적으로 화합물 1의 ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치²⁷⁻²⁹⁾의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 1의 구조는 Fig. 2에 나타난 것과 같이 quercetin으로 동정하였으며, 화합물 2의 ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치³⁰⁻³²⁾의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 2의 구조는 Fig. 2에 나타난 것과 같이 (-)-epicatechin으로 동정하였다.

토복령의 항산화 활성 주성분으로 단리한 quercetin과 (-)-epicatechin에 대해서도 분획물과 같은 항산화 실험을 실시한 결과, DPPH법을 이용한 free radical 소거효과는 Table IV에 나타난 바와 같이 α -tocopherol 보다는 우수하고 BHA와는 거의 유사한 효과를 나타내었고, Rancimat법에 의한 지질 산패 억제 실험을 실시한 결과에서는 Table V에 나타난 것과 같이 quercetin과 (-)-epicatechin 모두 4종의 식용유지에서 대조군인 α -tocopherol과 BHA 보다는 우수한 효과를 보였으며 특히 (-)-epicatechin은 lard oil에서 강력한 지질 산패 억제 효과를 보였다.

결 론

현대 사회의 노령화와 식습관, 환경의 급속한 변화에 따라 다양한 성인병들이 증가되고 있으며 또한 산화적 스트레스에 의해 발생하는 활성산소가 각종 질병 및 노화의 중요한 원인 물질임이 인정됨에 따라 free radical 및 활성산소를 제거 또는 약화시키는 항산화제의 개발에 대한 연구가 크게 부각되고 있다. 그러나 지금까지 개발되어진 다양한 천연 및 합성 항산화제들은 독성, 유해성 및 약효면 등에서 한계를 지님으로서 이와 같은 문제점을 해결하기 위한 연구의 하나로 천연물이나 약용식물로부터 새로운 항산화제를 개발하기 위하여 토복령에 대하여 항산화 효과 및 항산화 활성 주성분 규명 연구를 실시한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. 토복령의 용매별 분획물에 대하여 DPPH법, Ferric-Thiocyanate법 및 Rancimat법에 의해 항산화 활성을 측정된 결과, 토복령의 EtOAc 분획물이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

2. 토복령의 항산화 활성 주성분을 규명하기 위하여 우수한 항산화 효과를 나타낸 EtOAc 분획물에 대하여 항산화 활성을 검토하면서 소분획 및 주성분 단리를 실시한 결과 소분획물 3과 4로부터 각각 화합물 1과 2를 분리하였다.

3. 분리된 화합물 1과 2의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치의 spectral data와 비교 분석한 결과 화합물 1은 quercetin으로 화합물 2는 (-)-epicatechin으로 동정하였다.

4. 단리된 quercetin과 (-)-epicatechin의 항산화 활성을 DPPH법 및 Rancimat법에 의해 실시한 결과 quercetin과 (-)-epicatechin 모두 대조군인 α -tocopherol 보다는 우수하고, BHA와는 유사 또는 우수한 항산화 효과를 보였다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2004년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Kim, T. J. (1993) Alpine flowers of korea, 542. Kyo Hak Sa, Seoul.
- Park, J. H., Kim, J. M. and Do, W. I. (2002) Pharmacognostical study on the To Bog Ryung. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 169-172.
- Son, K. H., Seo, J. H., Lee, J. M., Kwon, S. J., Chang, S. Y. and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative determination of dioscin from *Smilacis Chinae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 153-156.
- Song, J. H., Kwon, H. D., Lee, W. K. and Park, I. H. (1997) Antimicrobial activity of crude extracts from *Smilax China* Root. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 560-564.
- Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1989) Steroidal saponins from the Rhizomes of *Smilax china*. *Kor.*

- J. Pharmacogn.* **20**: 76-82.
6. Lee, S. O., Kim, M. J., Kim, D. K. and Choi, H. J. (2005) Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 139-147.
 7. Papa, S. and Skulachev, V. P. (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* **174**: 305-319.
 8. Fukuzawa, K. and Takaishi, Y. (1990) Antioxidants. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* **1**: 55-70.
 9. Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. *Drugs*, **42**: 569-605.
 10. Cerutti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* **344**: 862-863.
 11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1984) Lipid peroxidation, oxygen radical, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet.* **23**: 1396-1397.
 12. Corl, M. M. (1974) Antioxidant activity of tocopherol and ascorbylpalmitate and their mode of action. *JAOCS.* **51**: 321-325.
 13. Coleman, M. D., Fernandes, S. and Khanderia, L. A. (2003) A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamin E, C and α -lipoic acid) in diabetic volunteers using *in vitro* methaemoglobin formation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **14**: 69-75.
 14. Monsen, E. R. (2000) Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients : vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.* **100**: 637-640.
 15. Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M. and Ogiso, T. (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole on F 344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**: 343-352.
 16. Branen, A. L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS.* **52**: 59-63.
 17. Yu, W., Zhao, Y. and Shu, B. (2004) The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids. *Food Chem.* **86**: 525-529.
 18. Choi, S. I., Lee, Y. M. and Heo, T. R. (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 282-288.
 19. Fukumoto, L. R. and Mazza, G. (2000) Assessing antioxidant and peroxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3597-3604.
 20. Lim, D. K., Choi, U. and Shin, D. H. (1996) Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 83-89.
 21. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K. (1968) Biochemical studies of physiological function of tocopheronolactone.1. *Yakugaku Zasshi*, **88**: 678-683.
 22. Yoshikawa, M., Harada, E., Miki, A., Tsukamoto, K., Liang, S. Q., Yamahara, J. and Murakami, N. (1994) Antioxidant constituents from the fruit hulls of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in vietnam. *Yakugaku Zasshi*, **114**: 129-133.
 23. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983) Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosemaria officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 521-528.
 24. Chen, C. W. and Ho, C. T. (1995) Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *J. Food Lipids*, **2**: 35-46.
 25. Lim, D. K., Choi, U. and Shin, D. H. (1996) Antioxidative of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 77-82.
 26. Choe, S. Y. and Yang, K. H. (1982) Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**: 283-288
 27. Yoon, I., Wee, J. H., Moon, J. H., Ahn, T. H. and Park, K. H. (2003) Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanum* Miquel. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 499-502.
 28. Peng, Z. F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N. K., Chia, T. F., Tan, S. N. and Chia, L. S. (2003) Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, **62**: 219-228.
 29. Witting, J., Herderich, M., Graefe, E. U. and Veit, M. (2001) Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography B.* **753**: 237-243.
 30. Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T. and Terao, J. (2003) Structure of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin : differences between human and rat. *Free Radical Biol. Med.* **34**: 840-849.
 31. Berregi, I., Santos, J. I., Campo, G. and Miranda, J. I. (2003) Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ¹H-NMR. *Talanta*, **61**: 139-145.
 32. Cren-Olive, C., Wieruszkeski, J. M., Maes, E. and Rolando, C. (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C-NMR. *Tetrahedron Lett.* **43**: 4545-4549.

(2005년 6월 17일 접수)