

차가버섯의 온도단계별 물추출물의 항산화성 비교

이상옥¹ · 김민정¹ · 김동균¹ · 최현주^{2†}

¹(주)네스코

²인제대학교 바이오헬스소재 연구센터

Antioxidative Activities of Temperature-stepwise Water Extracts from *Inonotus obliquus*

Sang-Ok Lee¹, Min-Jeong Kim¹, Dong-Gyun Kim¹ and Hyun-Ju Choi^{2†}

¹NESCO Ltd., Gimhae 621-891, Korea

²Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Abstract

The efficacy of extraction from *Inonotus obliquus* was examined from the points of antioxidative characteristics and some antioxidative compounds. To enhance the efficient extraction for the effective components from *Inonotus obliquus*, temperature-stepwise water extraction method was applied. Temperature-stepwise water extracts were prepared for 8 hrs as follows: the first extract at 80°C, the second extract from the residue of the first extract at 100°C, and the third extract from the residue of the second extract at 120°C. Antioxidative activities were determined by electron-donating ability of DPPH· free radical, scavenging ability of ABTS⁺ radical cation, and by inhibiting ability of linoleic acid autoxidation. In results, the first extract showed the least antioxidant capacity, and the third extract showed the highest antioxidant capacity. The third extract also had the greatest amounts of phenolic compounds and flavonoids. Amounts of phenolic compound from each extract were almost proportional to the radical scavenging activities and linoleic acid autoxidation inhibiting ability ($r=0.960\sim 0.980$, regression analysis). Furthermore, the effect of the pooled extract of all three extractions of *Inonotus obliquus* on the lipid peroxidation reacted with active oxygen species (KO_2 , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) and metals (Fe^{2+} , Cu^{2+}) was evaluated by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The pooled *Inonotus obliquus* extracts lowered the amounts of TBARS formed by all of the active oxygen species and metals. Especially, these lowering effects were pronounced in the reaction with $\cdot\text{OH}$ and Fe^{2+} . These results suggest that the pooled temperature-stepwise extract from *Inonotus obliquus* could be potential functional materials to reduce the oxidation of lipids and other compounds induced by free radicals.

Key words: *Inonotus obliquus*, antioxidant, temperature-stepwise, DPPH, ABTS

서 론

산소는 대부분 생물에 있어 생체내 에너지를 만드는 과정에서 필수불가결한 분자이지만 호흡과정에서 들어 마신 산소중 일부분(약 2~3%)은 활성산소라고 하는 유독 작용을 하는 물질로 전환되어 생체에 큰 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 유해 활성산소는 생체내의 조건에서 뿐만 아니라 환경적인 요소에 의해서도 끊임없이 생성되고 있고, 그 종류에는 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, $\text{O}_2\cdot^-$), 히드록시 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$), 단일항 산소(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$), 하이포 아염소산염(hypochlorite, OCl^-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 등이 있으며 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의

세포성분들을 공격하기 쉽게 되어 산화적 스트레스(oxidative stress)의 환경이 조성된다. 이와 같은 활성산소들로 인하여 세포들은 적혈구의 용혈 및 변형 초래, 각 조직의 장애, 염증반응, 류마치스, 동맥경화, 알츠하이머, 심혈관 질환, 신경학적 질환 등을 비롯한 각종 장애들이 야기되고 또한 신체의 면역체계를 공격하여 아토피성 피부염, 천식, 알레르기성 질환, 생활습관병과 관련된 갖가지 질환의 유발과도 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다(1-3). 유해 활성 산소를 제거하는 물질이 바로 항산화물질로서 생체 내에 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalase), 글루타티온(glutathione) 등이 있어 산화반응의 방어역할을 하고 있다(1). 한편 식품분야에서의 항산화제는 식품의 가공 및 저장시 자동산화의 방지목적으로 사용되고 있

[†]Corresponding author. E-mail: chjiinc@hanmail.net
Phone: 82-55-320-3665, Fax: 82-55-334-3426

으며, 지금까지 항산화성 효과와 경제성을 겸비한 폐놀계 합성물질인 부틸화히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene)과 부틸화히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole)이 많이 사용되어 왔는데 이들의 인체에 대한 유해성이 보고되고 난 뒤(4,5) 사용이 점차 감소하고 있는 추세이다. 이와 같이 항산화성 물질은 식품의 산패를 방지하는 식품첨가물로서 뿐만 아니라 생체 내에서 유해활성산소와 관련된 노화현상 및 생활습관병을 위시한 각종 질병에 뛰어난 예방효과가 인정되고 있어 각종 천연물유래의 항산화제의 개발이 그 어느 때보다 활발히 진행되고 있다(6,7).

차가버섯(*Inonotus obliquus* 또는 *Fuscosporia obliqua*)은 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaeaceae)에 속하는 다년생의 담자균 버섯으로, 자연 상태에서 시베리아, 핀란드, 노르웨이, 우크라이나, 홋카이도 등의 북위 45도 이상의 춥고 습한 북반구에 분포하며, 일반적으로 자작나무, 오리나무, 마가목 등의 줄기나 그루터기에 자생하는 극내한성 버섯이다(8). 백색부후균의 일종으로, 자연 상태에서 성장하면 검은색의 균핵 덩어리가 되어 자작나무 등의 줄기에 기생하는 것으로 알려져 있으며 차가 또는 차가(Chaga), 붓나무혹버섯, 백화나무버섯 또는 검은자작나무버섯이라고도 알려져 있다. 러시아에서는 1958년부터 연구가 시작되어 차가버섯 추출물이 항종양활성을 보이며 아로마틱 폴리페놀성 성분 중 라노스테롤, 이노토디올, 베틀린과 같은 트리테르페노이드(triterpenoid) 물질이 항종양활성을 가지거나 종양의 활성을 아주 느리게 한다는 사실이 보고되었다(9-13). 일본에서는 카바노아나타케라고 부르고 있으며 Ichimura 등(14)에 의해 HIV-1 프로테아제(protease)의 저해 효과가 보고되었으며 항돌연변이 활성 또한 보고되었다(15).

차가버섯의 알려진 유효성분으로는 β -글루칸, 트리체페놀산, 호로마도겐, 폴리페놀, 옥시페놀카르본산, 휘노친, 차가산(60%), 바닐라산, 파라옥시향산, 프테린, 스테롤, 리그닌 등의 많은 생리활성성분이 있는 것으로 알려져 있으며 특히 항산화력에 있어서는 알려진 어떤 버섯보다도 SOD 유사활성을 나타내는 물질이 가장 많다는 분석결과도 있다(9-11, 16). 이들 성분들은 물리 화학적 성질의 차이에 의해 용해성이나 휘발성이 다르다고 볼 수 있으며, 특히 온도에 대한 용해성이 다르기 때문에 추출온도는 유효성분의 효과적인 용출을 위해서 매우 중요한 요인이라 사료된다. 따라서 차가버섯의 유효성분을 섭취하기 위한 추출 가공방법이 중요하며 본 연구는 종래의 추출방법을 개선함에 목적이 있다.

추출 공정에서 고압으로 단순 열수 추출하는 경우, 열에 약하거나 휘발성이 강한 유효성분의 파괴나 소실을 피할 수 없어 천연 유효성분을 충분히 추출해내지 못하거나, 그 반대로 불필요 내지 때로는 유해한 성분의 용출 가능성을 배제하지 못하는 기술적 결함을 가지고 있다. 또한, 저온으로 추출할 경우 고온 혹은 장시간 방치해야만 제대로 추출되는 성분 역시 효율적으로 추출되지 못하거나, 공정 효율성을 무시하

고 무조건 장기간 방치할 수 없는 경제적 문제 역시 극복하기 어려운 문제점이었다.

이러한 관점에서, 일차적으로 고온의 조건에서 파괴되거나 휘발성 등으로 인해 소실가능성이 높은 유효성분은 저온 추출하고, 고온에서만 추출 가능한 유효성분은 상대적으로 높은 온도에서 단계별로 회수한 후, 각 추출물에 대하여 라디칼 소거능을 가지는 항산화성의 몇 가지 유효성분들의 양을 비교 검토한다면 상기에 설명한 문제점을 해결할 수 있는 방안을 찾을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 유효성분을 최대한 회수할 수 있는 효과적인 추출법을 시도하여 추출온도와 항산화성 물질들 간의 상호 관계를 규명하고 지방산화에 대한 억제정도를 밝힘으로서 유해활성산소로 인해 야기되는 여러질환에 대한 유효한 건강식품으로서의 기능성을 평가하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시약

항산화 실험에 사용된 알파,알파-디페닐-베타-피크릴히드라질(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-아지노비스-(3-에틸-벤조티아졸린-6-황산)(2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS), 아황산칼륨(potassium persulphate), 부틸화 히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT), 부틸화 히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), Folin-Ciocalteu 시약, 갈산(gallic acid), 2-티오바르비탈산(2-thiobarbituric acid, TBA), 어유(fish oil from menhaden) 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품을 사용하였고 linoleic acid(리놀레산)는 Kanto Chemical Co.(Japan)의 제품을 사용하였다. 말론디알데히드(malonedialdehyde, MDA)는 1,1,3,3-테트라메톡시-프로판(1,1,3,3-tetramethoxy-propane, Aldrich, Steinheim, Germany)을 가수분해하여 조제하였으며 L-아스코르브산(L-ascorbic acid), 염화제이철(ferrous chloride), 암모늄 티오시아나이드(ammonium thiocyanate) 등의 시약은 Junsei Chemical Co.(Japan)의 제품을 사용하였고 그 외의 시약은 특급을 사용하였다.

시료 추출

본 실험에 사용한 차가버섯은 러시아에서 수입한 것으로, 선별, 수세 및 건조하여 분말로 만들어 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 차가버섯 건조분말 80 g에 3차 증류수 700 mL를 가하여 80°C에서 8시간동안 진탕 추출하고 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 1차 추출액을 얻었다. 2차 추출물은 1차 추출 후 남은 잔사에 같은 부피의 증류수를 가하고 100°C에서 8시간동안 진탕 추출 후 여과하여 얻었으며, 다시 같은 부피의 증류수를 남은 잔사에 가하여 120°C에서 8 hr 동안 추출 후 여과하여 3차 추출액을 얻었다. 얻어진 1차, 2차 및 3차 추출물을 각기 진공동결 건조한 후 -20°C의

냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)를 이용한 유리 라디칼 소거 효과

산화적 스트레스의 원인이 되는 유리기 소거효과를 확인하기 위하여 유리기인 DPPH 라디칼에 대한 차가버섯 물추출물의 전자 공여능(electron-donating ability) 또는 라디칼 소거능(radical-scavenging activity)을 Blois(17)의 수정법(18)으로 측정하였다. 즉, 빛을 차단시킨 용기를 사용하고 99.9% 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 1 mL와 각각의 추출 시료액 0.25 mL을 가하여 잘 혼합한 후 30분 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 추출 시료액은 3차 증류수에 250 ppm 농도로 녹여 실험에 사용하였다. DPPH 소거능은 517 nm에서의 대조구와 처리구의 흡광도차를 대조구의 흡광도로써 나눈 값을 백분율로 하여 나타내었다. 대조구는 시료 용액 대신 시료를 녹인 용매를 가하여 흡광도를 측정하였다. 이때, 아스코르브산 50 ppm과 30 ppm 용액을 시료로 하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 비교하였다. 실험 측정은 세번 반복 실험하여 평균값을 사용하였다.

ABTS(2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) 양이온($ABTS^{\cdot+}$) 소거효과

Leong과 Shui(19)의 방법에 따라 차가버섯 물추출물의 항산화력의 측정은 ABTS 양이온의 소거능을 실험하였다. ABTS는 유리기들(hydroxyl, peroxy, alkoxy, inorganic radicals)과 반응하여 414 nm에서 흡광하는 상대적으로 안정한 양이온($ABTS^{\cdot+}$)을 생성한다. 용액의 조제는 7.4 mM ABTS 용액에 2.6 mM 과황산칼륨(potassium persulphate) 용액을 혼합하여 암소에서 12시간~16시간 반응시켜 414 nm에서 흡광도가 1.5 정도가 되도록 희석하였다. 이 희석액 1 mL에 시료 50 μ L를 혼합하고 실온에서 90분간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 아스코르브산 50 ppm 용액과 30 ppm 용액을 시료로 하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 비교하였다. 414 nm에서 대조구와 처리구의 흡광도차로 나타내고 시료의 항산화력은 아래의 식으로 계산되었다. RAEAC(relative ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)은 아스코르브산의 $ABTS^{\cdot+}$ 소거능에 대하여 시료의 상대적인 소거능을 나타낸 것으로 $ABTS^{\cdot+}$ 양이온($ABTS^{\cdot+}$)에 대한 아스코르브산의 소거능을 1.0로 볼 때 동일농도의 시료의 $ABTS^{\cdot+}$ 양이온($ABTS^{\cdot+}$) 소거능을 나타낸 수치이다. 시료의 색깔을 보정하기 위하여 ABTS 용액 대신 증류수를 가하고 시료를 첨가한 혼합물을 사용하였다. 실험 측정은 세번 반복 실험하여 평균값을 사용하였다.

$$RAEAC = \frac{C_{aa}}{\Delta A_{aa}} \times \frac{\Delta A_s}{C_s}$$

ΔA_{aa} : L-아스코르브산을 넣었을 때의 흡광도값의 변화

C_{aa} : 사용한 L-아스코르브산의 농도

ΔA_s : 추출시료를 넣었을 때의 흡광도값의 변화

Cs: 사용한 추출시료의 농도

Ferric thiocyanate(TCA)법에 의한 리놀레산의 자동산화 방지 효과

차가버섯의 온도별 물 추출물이 생체막 지질의 산화에 대한 저해 작용의 가능성을 추정하기 위하여 리놀레산에 대한 항산화 효과를 실험하였다. Osawa(20)의 방법에 따라 혼합 용액은 각각의 추출 시료액 0.2 mL, 99.9% 에탄올에 녹인 2.5% 리놀레산 0.2 mL, 0.2 M 인산완충액 (pH 7.0) 0.4 mL, 증류수 0.2 mL을 가하여 반응 혼합물을 만든 후 밀봉을 하여 40°C 암소에 보관하면서 반응 후 13일까지 측정하였다. 이 반응 혼합물 0.1 mL을 취하여 시험관에 넣고 70% 에탄올 3 mL, 암모늄 티오시안산염(0.3 g/mL in H_2O) 용액 0.1 mL, 염화제이철(2.45 mg/mL in 3.5% 염산) 용액 0.1 mL을 가하여 혼합한 후 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하고 활성 비교를 위해 합성 항산화제인 BHA를 각각 10 ppm과 100 ppm 농도로 사용하여 비교하였다. 실험 측정은 세번 반복 실험하여 평균치를 사용하였다. 각 추출물별 항산화성에 대한 차별성을 보기 위해서 40°C에서 반응 10일후의 과산화물 생성억제능(%), lipid peroxidation inhibition)을 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{과산화물 생성억제능 (\%)} = \{1 - (\text{Abs}/\text{Abc})\} \times 100$$

Abc: 500 nm에서의 대조구 흡광도

Abs: 500 nm에서의 검체 흡광도

총 페놀 함량 분석

시료의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약이 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량 분석하였다(21). 각각의 추출물 시료 100 μ L에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가하고 3분 동안 방치한 다음 50% Folin-Ciocalteu 시약을 100 μ L 가하여 3분 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 갈산 검량선과 비교하여 총 페놀의 함량(μ g gallic acid equivalent/mL)을 구했으며 공시험은 반응 혼합물에서 50% Folin-Ciocalteu 시약 대신 각 추출물을 녹인 용매를 가한 혼합액을 사용하였다. 실험 측정은 세번 반복 실험하여 평균값을 사용하였다.

플라보노이드 함량

시료 중의 플라보노이드 함량은 Moreno 등(22)의 방법에 따라 측정하였다. 각 추출물 시료 0.1 mL와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합하고 이 혼합물 0.5 mL에 10% 암모늄질산염(ammonium nitrate) 0.1 mL, 1 M 초산칼륨(potassium acetate) 0.1 mL, 80% 에탄올 4.3 mL을 가하였다. 이 혼합액을 실온에서 40분간 방치한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 케르세틴(querceetin) 검량선과 비교하여 총플라보노이드의 함량을

구했으며, 공시험은 반응 혼합물에서 10% 암모늄질산염 0.1 mL과 1 M 초산칼륨 0.1 mL 대신 각 추출물을 녹인 용매를 가한 혼합액을 사용하였다. 실험 측정은 세번 반복 실험하여 평균값을 사용하였다.

어유 유화액(fish oil emulsion) 조제

pH 6.5로 조정된 0.1 M 말레산(maleic acid) 완충액 16 mL에 100 μ L의 트윈-20(Tween-20)을 넣고 교반한 후 1 mL의 어유(fish oil)을 넣고 30분간 교반하였다. 수산화칼륨 4조각을 넣고 교반하면서 1 N 염산으로 pH 6.5가 되도록 제조하였다. 유화액은 사용직전에 만들어 사용하였다.

반응혼합물 조제

반응혼합물은 어유 유화액 0.5 mL에 각종 산소종 (40 mM H₂O₂, 40 mM KO₂, 50 ppm FeCl₂, 40 mM H₂O₂+50 ppm FeCl₂(·OH), 50 ppm CuSO₄) 0.1 mL를 가하고, 1차, 2차 및 3차 추출물을 모두 혼합한 차가버섯 추출물 0.1 mL씩을 첨가하여 전체 반응액의 양이 1 mL가 되도록 증류수로 조정하여 2회 반복실험을 실시하였다. 활성산소종 자체가 지방 산화에 어느 정도 영향을 미치는가를 알아보기 위해서 산소종 대신 증류수를 가하여 TBARS 분석을 행하였다.

Thiobabutaric acid reactive substances(TBARS) 분석

Thiobabutaric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust(23)의 방법에 따라서 반응혼합물 당 생성된 말론디알데히드(malonedialdehyde, mg)량을 측정하였다. 1 mL 반응혼합물이 채워진 시험관을 37°C 수조에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 종료되자마자 7.2% BHT 50 μ L를 혼합물에 가하여 산화반응을 정지시켜 반응혼합물을 잘 섞은 다음, 2 mL의 TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 45분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 5분간 식힌 후 4,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리한 후 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 차가버섯 추출물이 색소 성분을 가지고 있고 이 성분이 지방산화를 촉진시킬 수 있는 가능성이 있으므로 색소에 의한 흡광을 보정을 해주기 위하여 공시험은 반응 정지제인 BHT를 먼저 넣고 추출물을 첨가한 다음 반응은 시키지 않고 바로 TBARS 분석을 행하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 Statview 512*통계 프로그램을 이용하

여 Student's *t*-test, regression analysis, 또는 ANOVA test를 한 후 post hoc Scheffe' test에 의하여 각 실험군간의 유의적인 차이를 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

추출횟수별 고형분 함량

예비실험을 통하여 차가버섯으로부터 추출되는 고형분을 차가버섯 농도 및 추출시간별로 검토한 결과 버섯의 약 10배량 정도에서 가장 많은 고형분의 양이 추출되었으며 추출시간별로 추출되는 고형분의 함량을 측정한 결과 추출시간을 8시간보다 더 길게 하였을 경우에도 고형분 함량은 거의 증가하지 않았다. 따라서 고형분 추출량의 관점에서 상기의 조건이 적절한 추출조건으로 사료되었다. 따라서 차가버섯 건조분말 80 g에 증류수 700 mL를 가하여 80°C, 100°C, 및 120°C에서 연속하여 3차례에 걸쳐 추출하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 1차 추출에서 총 고형분의 63%가 추출되었으며 2차 추출에서 25%, 3차 추출물에서 약 12% 정도가 추출되었다. 이상의 결과로 보아 80°C에서 1차 추출할 경우 반 이상의 고형분이 나옴을 알 수 있으며 추출횟수가 증가함에 따라 고형분의 양은 현저히 감소함을 알 수 있었다.

전자공여능 측정

각 온도별 차가버섯 물추출물을 동일한 시료농도 250 ppm(반응물에서의 실제 최종 농도는 50 ppm)으로 조제하여 전자공여능(electron-donating ability)을 측정한 결과 1차, 2차, 및 3차 추출물은 각각 $56.5 \pm 1.9\%$, $76.7 \pm 0.5\%$, 및 $83.9 \pm 0.9\%$ 를 나타내어 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1). 이와 같은 사실은 온도가 낮은 상태에서 추출한 것 보다 높은 곳에서 추출한 경우 항산화력이 더 높은 물질이 추출됨을 시사한다. 또한 잘 알려진 항산화물질인 아스코르브산을 같은 방법으로 실험했을 때 아스코르브산 50 ppm(반응물에서의 실제 최종 농도는 10 ppm)에서는 $88.6 \pm 0.4\%$, 30 ppm(반응물에서의 실제 최종 농도는 6 ppm)에서는 $73.8 \pm 2.3\%$ 를 나타내었다. 따라서 50 ppm 농도의 2와 3차 추출물 시료의 수소공여능은 아스코르브산 6 ppm에서 10 ppm정도의 수소공여능을 보였으며 그 중 수소공여능이 가장 높은 3차 추출물인 경우 RC₅₀(자유 라디칼의 50% 저해시키는데 요구되는 농도)이 약 30 ppm 정도로서 Cho 등(24)이 보고한 식용식물의 항산

Table 1. Preparation and yield of water-soluble extraction from *Inonotus obliquus*

	Extraction conditions		
	1st extraction	2nd extraction	3rd extraction
Extraction temperature (°C)	80	100	120
Extraction time (hrs)	8	8	8
Solid obtained from extracts (g)	14.3	5.7	2.7
Yield (%) ¹⁾	63.0	25.1	11.9

¹⁾Percentage of each extract solid to total solid obtained (22.7 g).

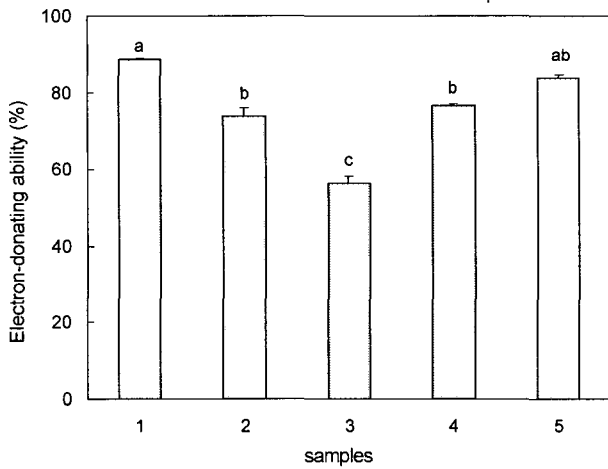


Fig. 1. Electron-donating ability of three different water-soluble extracts from *Inonotus obliquus* and ascorbic acid. DPPH free radical scavenging activity for test sample was determined with 0.15 mM DPPH methanolic solution. Each extract sample was used at the final concentration of 50 ppm in the reaction mixture. Values represent means \pm SE of triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ using an ANOVA test and Scheffe' test. Symbols are as follows: 1, ascorbic acid 10 ppm; 2, ascorbic acid 6 ppm; 3, 1st extract; 4, 2nd extract; 5, 3rd extract.

화효과를 검색한 결과의 경우와 비교해 보아도 참취임을 제외하고 여타 식용식물에 비하여 차가버섯 추출물이 월등히 높은 항산화력을 나타내었다.

ABTS 양이온($ABTS^{\cdot+}$) 소거 효과

Miller 등(25)은 $ABTS^{\cdot+}$ 발생 방법으로서 메트미오글로빈(metmyoglobin)의 과산화효소(peroxidase)를 사용하였고 이것이 페릴미오글로빈(ferryl myoglobin)과 반응하여 생성되는 $ABTS$ 는 650 nm, 734 nm, 820 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 것을 이용하였다. 이후 Roberta 등(26)은 $ABTS$ 용액과 과황산칼륨 용액을 반응시켜 생성되는 $ABTS$ 는 415 nm, 645 nm, 734 nm, 815 nm에서 유의적인 흡광도를 나타낸다고 하였는데 본 실험에서는 Leong과 Shui(19)의 방법에 따라 414 nm에서 최대의 흡광도를 나타내는 것을 이용하였다.

차가버섯 1차, 2차 및 3차 추출물의 건조획분을 동일한 250 ppm 농도로 조제하여 시료로 사용하여 $ABTS^{\cdot+}$ 소거능

을 측정하였다(Table 2). $ABTS$ 양이온($ABTS^{\cdot+}$)에 대한 아스코르브산의 소거능을 1.0로 볼 때 동일농도의 1차, 2차 및 3차 추출물은 각각 0.237 ± 0.001 , 0.388 ± 0.005 및 0.432 ± 0.003 의 $ABTS$ 양이온($ABTS^{\cdot+}$) 소거능을 나타내었고, 앞의 DPPH 자유 라디칼 소거효과와 마찬가지로 1차 추출물의 항산화력은 상대적으로 높은 온도에서 추출되는 2차, 3차 추출물의 항산화력에 비하여 월등히 낮음을 알 수 있었다. 상기 두 가지의 방법의 항산화력을 비교해 보면 3차 추출물의 경우 DPPH 법에 의해 측정된 것이 아스코르브산의 항산화력의 약 20%인데 반하여, $ABTS$ 법에 의한 약 43%가 나와 $ABTS$ 에 의한 방법으로 측정된 항산화력이 다소 높게 나왔다. 이것은 라디칼이라는 점에서는 같으나 DPPH 경우는 자유 라디칼이지만 $ABTS$ 는 양이온 라디칼이라는 점에서 또는 페놀물질의 종류가 다름에 따라 두 기질에 결합하는 정도가 다르며 결국 라디칼을 제거하는 능력이 차이가 나는데 기인하는 것으로 사료된다(27).

차가버섯의 온도별 물 추출물의 리놀레산 자동산화 저해 효과

리놀레산을 기질로 한 과산화 반응 하에서 과산화물의 생성정도를 측정함으로써 차가버섯 물 추출물 시료의 항산화 활성을 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. BHA 또는 차가버섯 추출물대신 증류수를 첨가한 대조군은 2일 경과 후부터 12일까지 과산화물이 급격히 증가한데 반하여 반응 혼합물에서의 최종 농도가 BHA 10 ppm, 100 ppm, 그리고 각 차가버섯 추출물을 50 ppm되도록 첨가하였을 때 12일까지 다소의 과산화물의 증가를 보였을 뿐 90%이상의 지방산화 억제효과가 나타났다. 따라서 1차, 2차 및 3차 차가버섯 추출물 50 ppm에서 리놀레산의 자동 산화를 현저히 감소시킴을 알 수 있었다. 그러나 각 추출물이 50 ppm에서는 자동산화 억제 효과에 있어 서로간의 차이가 보이지 않아 각 추출물별 차별성을 보기 위하여 각 시료를 10 ppm농도로 조제하여 40°C에서 10일간 과산화물 생성 억제능(%)을 계산한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 1차, 2차, 및 3차 추출물 10 ppm의 농도에서 지방산화 억제효과가 각각 $59.3 \pm 1.6\%$, $80.0 \pm 0.1\%$, 및 $87.5 \pm 0.3\%$ 로 나타났으며 추출온도가 높을수록 리놀레산 지방산

Table 2. Relative scavenging activities of $ABTS^{\cdot+}$ free radical in water-soluble extracts from *Inonotus obliquus* and L-ascorbic acid

RAEAC ¹⁾	Samples			
	L-Ascorbic acid	1st extraction	2nd extraction	3rd extraction
	$1.001 \pm 0.008^{a2)}$	0.237 ± 0.001^b	0.388 ± 0.005^c	0.432 ± 0.003^d

¹⁾RAEAC (relative ascorbic acid equivalent antioxidant activity) was expressed as a value compared to antioxidant activity of ascorbic acid and calculated using following equation:

$$RAEAC = \frac{C_{aa}}{\Delta A_{aa}} \times \frac{\Delta A}{C_s}$$

ΔA_{aa} is the change of absorbance after addition of ascorbic acid, ΔA is the change of absorbance after addition of extract samples, C_{aa} is the concentration of ascorbic acid standard solution, C_s is the concentration of extract samples.

²⁾Values represent means \pm SE of triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ using an ANOVA test and Scheffe' test.

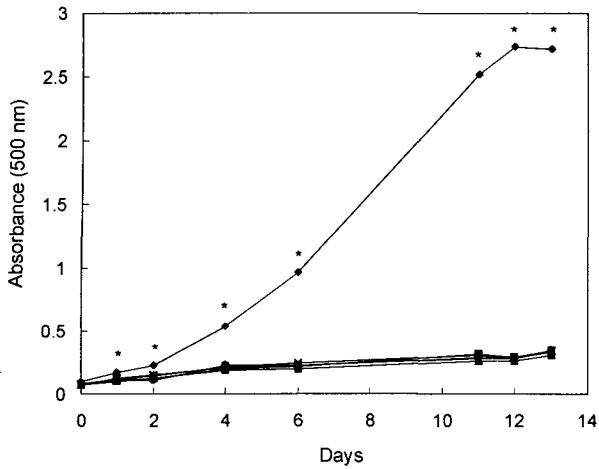


Fig. 2. Antioxidative activity of water-soluble extracts from *Inonotus obliquus* and BHA in linoleic acid system measured by the thiocyanate method.

Asterisk means a significant difference between control and the other group. ◆◆: Control, ■■: *Inonotus obliquus* 1st extract (50 ppm), ●●: *Inonotus obliquus* 2nd extract (50 ppm), ▲▲: *Inonotus obliquus* 3rd extract (50 ppm), ▼▼: BHA 100 ppm, ××: BHA 10 ppm.

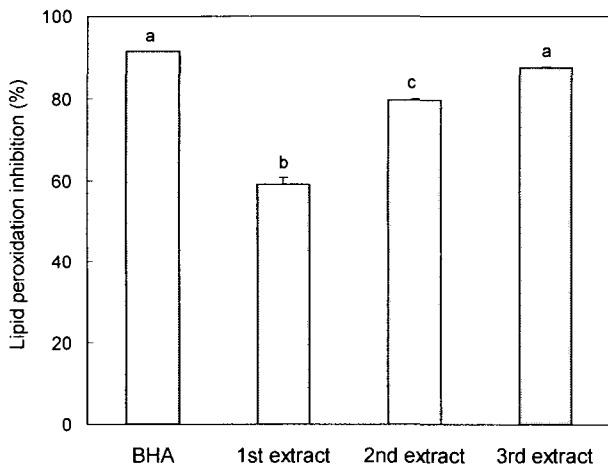


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory activities of each water-soluble extraction from *Inonotus obliquus* by ferric thiocyanate method.

Values represent means \pm SE of triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ using an ANOVA test and Scheffe' test. Concentration of test solution in the reaction mixture is 10 ppm.

화에 대한 저해효과가 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 BHA의 경우 91.4%보다 다소 낮게 나타났지만 Kang 등(28)이 보고한 감잎의 항산화효과가 200 ppm정도이며 Kähkönen 등(29)이 보고한 여러 식물의 최고 저해율이 500 ppm정도인 결과 및 Lee(2)의 참취잎에서 가장 높은 항산화력을 나타낸 에테르의 획분이 25 ppm에서 85% 저해를 보인 것보다 훨씬 높은 저해효과를 보였다. 일반적으로 추출용매에 있어 극성이 낮은 획분들이 높은 획분들에 비해 반응기질인 리놀레산에 대한 친화성 및 용해성이 크기 때문에 항산화력이 높은 것으로 나타나는데(28,30) 본 실험에서는 추출을 위한 용매가 극성이 가장 높은 물임에도 불구하고 리놀레산에 대한 항산화력이 높게 나타난 결과는 괄목할만한 것으로 사료된다. 이상의 결과로 미루어 보아 차가버섯 3차 추출물 속에 리놀레산이 산화된 주생성물인 과산화옥타카데킨산(hydroperoxy-octadecadienoic acid) 이성질체와 옥소옥타카데킨산(oxooctadecadienoic acid) 이성질체 등에 대하여 수소공여체로 작용하는 물질이 가장 많이 함유되어 있으며 이와 같은 결과는 생체막을 구성하는 지질의 과산화를 가장 효과적으로 억제할 수 있는 가능성이 높은 것으로 사료된다(31).

차가버섯의 온도별 물 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량

차가버섯 1차, 2차, 및 3차 추출물의 건조획분을 동일한 1,000 ppm 농도로 조제하여 갈산을 기준물질로 환산하여 총 페놀 함량을 측정하였으며 총 플라보노이드 농도는 케르세틴을 기준물질로 환산하였다(32)(Table 3). 그 결과 1차, 2차, 및 3차 추출물의 총페놀 함량이 각각 263 ± 5.8 , 372 ± 6.6 , $417 \pm 16.4 \mu\text{g/mL}$ 으로서 온도가 높아질수록 페놀화합물의 농도가 증가하였다. 폴리페놀의 대표적인 성분인 플라보노이드의 함량에 있어서도 $15.7 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$, $22.4 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$, $32.9 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 온도가 높아질수록 플라보노이드의 농도도 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 보아 추출온도가 높아질수록 추출되는 여타 물질에 비하여 페놀화합물 및 플라보노이드의 양이 상대적으로 증가하는 것으로 사료된다. 그러나 회수된 총 고형분에 함유된 총 페놀화합물 및 플라보노이드의 양은 1차 추출물, 2차 추출물, 3차 추출물의 순으로 적어졌다. 예비 실험에서 추출시간을

Table 3. Total phenolic compounds and flavonoids in water-soluble extracts from *Inonotus obliquus*

Compound	Samples	1st extraction	2nd extraction	3rd extraction
Phenolics ¹⁾	Concentration (μg gallic acid equivalent/mL) ³⁾	$263 \pm 5.8^{\text{a}5)}$	$372 \pm 6.6^{\text{b}}$	$417 \pm 16.4^{\text{b}}$
	Total contents (g) ⁴⁾	3.76	2.12	1.13
Flavonoids ²⁾	Concentration (μg quercetin equivalent/mL) ³⁾	$15.7 \pm 1.5^{\text{a}}$	$22.4 \pm 1.7^{\text{a}}$	$32.9 \pm 1.8^{\text{b}}$
	Total contents (g) ⁴⁾	0.24	0.13	0.09

¹⁾ Sample was analyzed using gallic acid as a standard.

²⁾ Sample was analyzed using quercetin as a standard.

³⁾ Sample was dissolved with distilled water at the concentration of 1 mg/mL and value was expressed as mean \pm SE for the triplicates.

⁴⁾ Contents in total solid extract recovered.

⁵⁾ Values represent means \pm SE of triplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$ using an ANOVA test and Scheffe' test.

더 길게 하여도 더 이상의 고형분의 증가가 없는 것으로 미루어 보아 각 단계에서 추출되는 페놀화합물의 종류도 구조적으로 다른 것일 가능성이 높은 것으로 사료된다. 페놀화합물들은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 탄소수에 따라 페놀산, 탄닌, 플라보노이드 등의 다양한 물질로 나눌 수 있는데 최근에는 다양한 식물을 대상으로 항산화 활성과 기능성 소재로서의 활용에 대한 연구가 진행되고 있는 추세이다(33). 이와 같이 페놀화합물이 다양한 항산화력을 나타내는 것은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제로서, 활성산소의 소거제로서, 사슬절단항산화제(chain breaking antioxidants) 등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다(33). 플라보노이드는 페놀화합물 중에서 자연적으로 생성되는 가장 큰 그룹의 하나로서 이것은 다시 안토시아닌(anthocyanins), 칼콘(chalcones), 오론(aurones), 플라본(flavones), 플라보놀(flavonols) 및 이들의 유도체 등으로 나눌 수 있다. 현재까지 페놀화합물 및 플라보노이드의 구체적인 구조에 따른 항산화 활성과의 상관성에 대한 연구도 있으나 (34,35) 추출온도에 따라 추출되는 페놀화합물의 구조적 다양성에 대한 연구도 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

이상과 같이 세 가지 측면에서의 항산화 효과를 검토한 결과 세 가지 방법 모두에서 3차 추출물이 가장 높은 항산화력을 나타내었음을 알 수 있었다. 따라서 페놀 화합물과 플라보노이드의 유효성분과 3가지 항산화력과의 상호관련성을 보기 위해 regression analysis를 행하였다. 페놀화합물과 DPPH, ABTS, 및 리놀레산 자동산화 저해효과와의 관련성은 각각 R=0.960, 0.977, 0.967이었고 세 가지 경우 모두 p=0.0001 나타났다. 또한 플라보노이드와 각 항산화성과의 관련성은 R=0.873, 0.882, 0.887이었고 p=0.0021, 0.0017, 0.0014를 나타내었다. 그 결과 플라보노이드보다는 페놀성 물질과 항산화력과의 상관관계가 더 높은 것으로 나타났으며 항산화력을 나타내는 물질은 총페놀의 함량이 크게 기여함을 알 수 있었다.

차가버섯 물 추출 혼합물의 어유를 이용한 지방산화에 미치는 영향

상기와 같이 차가버섯 추출물을 온도별로 추출한 후 각 추출물을 혼합하여 동결건조하여 시료를 조제한 후 이 시료가 지방산화에 미치는 영향을 검토하였다. 먼저 활성산소종 자체가 지방산화에 어느 정도의 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 활성산소종 대신 증류수를 넣은 대조구와 각각의 활성산소종을 넣고 어유 유화액에서 반응을 시킨 후 TBARS 값을 측정하였다(Fig. 4). 활성산소가 첨가되지 않은 대조구에 비하여 ·OH 그 자체가 가장 강한 지방산화 촉진작용을 나타내었고 그 다음은 Fe²⁺, Cu²⁺, H₂O₂, KO₂ 순으로 촉진시켰다. 이와 같은 결과는 정도의 차이는 있으나 Kim 등(36)이 실험한 결과와 비슷한 결과로서 활성산소를 전혀 넣지 않은 대조구(0.39 MDA ppm)에 비하여 ·OH 첨가구의 경우 1.30

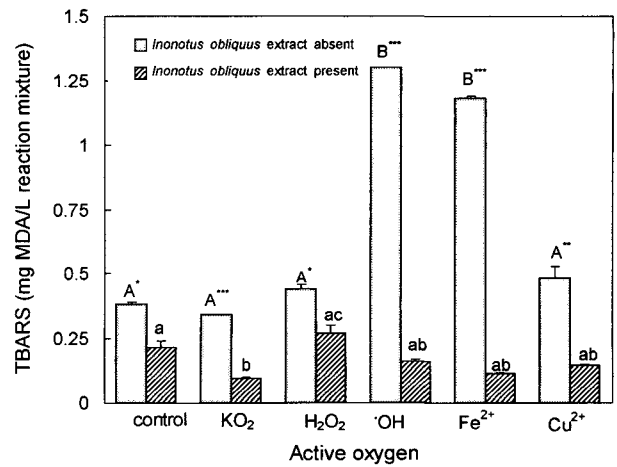


Fig. 4. Inhibitory effect of *Inonotus obliquus* water-soluble extract reacted with active oxygen species and metals on lipid oxidation in fish oil emulsion.

The final concentration of each element in the reaction mixture is as follows: 4 mM KO₂; 4 mM H₂O₂; ·OH, 5 ppm FeCl₂-4 mM H₂O₂; 5 ppm FeCl₂; 5 ppm CuSO₄; 200 ppm *Inonotus obliquus* extract. Values represent means ±SE of duplicate experiments and those with different alphabet letters are significantly different at p<0.05 using an ANOVA test and Scheffe test. Large and small character are expressed in *Inonotus obliquus* extract absence and *Inonotus obliquus* extract presence, respectively. Asterisk means a significant difference between extract absence and presence determined by Student's t-test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.01.

MDA ppm으로서 약 3배정도 지방산화를 증가시키는 효과가 있었고 H₂O₂ 첨가구는 0.45 MDA ppm로서 대조구에 비해 다소 증가 효과가 있었으며 4 mM 농도의 KO₂ 첨가구는 0.30 MDA ppm으로서 오히려 다소 지방 산화를 억제하는 효과가 있었다. 이와 같은 결과는 Halliwell과 Gutteridge(3)가 보고한 ·OH이 다른 산소종에 비해 지방산화를 일으키는 결정적인 역할을 한다는 내용과 잘 일치한다고 볼 수 있다. 이상의 여러 가지 산소종 및 금속 이온과 차가버섯 추출물이 공존하는 상태에서 지방산화의 정도를 측정할 결과 공히 차가버섯 추출물이 첨가되지 않은 구에 비하여 모두 훨씬 낮은 TBARS값을 나타내어 지방산화를 억제하는 효과가 우수한 것으로 나타났다. 활성산소종 중에서 ·OH에 대한 영향을 보면 이 라디칼과의 높은 포집능으로 인해 대조군 1.30 mg MDA/L을 0.16 mg MDA/L정도로 낮추어 다른 활성종에 비해 효과적으로 과산화물의 생성을 억제시켰다. Fe²⁺은 그 자체가 강한 지방산화촉진작용을 나타내며 이들 이온에 의한 지방산화의 정도는 추출물이 이들 금속 이온에 대한 결합능이 우수할수록 지방산화를 억제하는 항산화력이 높게 나타내는 것으로 알려져 있는데 차가버섯 추출물이 Fe²⁺ 이온에 대한 결합력은 매우 우수하여 높은 항산화능을 보인 것으로 사료된다. 실제 생체 내에서의 차가버섯의 항산화 효과를 현재 실험 중이며 이 결과가 나온다면 향후 생체 내의 조건에서 만들어지는 라디칼에 의해 생성되는 지방산화물을 포함한 부분 산화된 유해물질을 보호하기 위한 항산화제로서의 역할이 보다 명확해지리라 사료되어진다.

요 약

각종 산소 라디칼들이 생체내의 호흡효소계나 산화환원계에서 생성되어 노화와 각종 질병과 유관한 사실이 밝혀져 감에 따라 이들의 소거를 위한 항산화물질에 대한 관심이 높아지고 있는 시점에서, 본 논문에서는 차가버섯의 대표 유효성분인 항산화 성분을 최대로 추출해내기 위한 효과적인 추출법을 시도하고자 실행하였다. 차가버섯 건조분말을 80°C에서 8시간 추출한 것을 1차 추출물, 1차 추출 후 그 잔사물에 물을 첨가하여 100°C에서 8시간 추출한 것을 2차 추출물, 2차 추출 후 남은 잔사물에 물을 첨가하여 120°C에서 8시간 추출한 것을 3차 추출물로 하여서, DPPH 자유 라디칼에 대한 전자공여능, ABTS^{·+} 라디칼 양이온 소거능, 리놀레산 자동산화 저해 효과를 봄으로서 항산화능을 측정하였다. 결과에서 항산화력은 1차 추출물이 가장 낮았고 3차 추출물이 가장 높았고, 3차 추출물은 페놀 화합물과 플라보노이드 함량이 1차나 2차 추출물보다 유의적으로 많았고, 페놀 화합물 함량은 라디칼 소거능 및 리놀레산 자동산화 저해효과와 상관관계가 높은 것($r=0.960\sim 0.980$, regression analysis)으로 나타났다. 또한 각 온도에서의 추출물을 혼합하여 지방산화 촉진인자인 3종의 활성산소종(KO_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$)과 금속 이온(Fe^{2+} , Cu^{2+}) 존재 하에서 항산화 효과를 TBARS 값으로 측정한 결과, 차가추출물이 모두의 경우에서 TBARS 값을 낮추었으며 특히 $\cdot OH$ 와 Fe^{2+} 이온에 대하여 탁월한 항산화능을 보였다. 이상의 결과로 미루어 보아 자유 라디칼로 인해 야기되는 지방을 비롯한 그 산화물에 대하여 3단계 온도 추출법에 의한 차가버섯 추출물은 매우 유효한 항산화제로서 작용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

감사의 글

본 논문의 일부는 인제대학교 바이오헬스소재 연구센터 (Biohealth Products Research Center)의 2004년도 연구비를 일부 지원받아 수행되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Yoshhiko O. 1989. *SOD and active oxygen modulators*. NIHON-IGAKUKAN, Tokyo. p 129-278.
2. Lee SE. 2001. Antioxidative characteristics of Chamchwi (*Asper scaber* Thunb.) and identification of the active compounds. *PhD Dissertation*. Pusan National University. p 1-30.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
4. Maeura Y, Weisburger JH, Williams G. 1984. Dose-dependent reduction of N-2-fluorenylacetylacetamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene. *Cancer Res* 44: 1604-1610.
5. Branen AS. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated dihydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 1: 59-63.
6. Jialal I, Grundyl S. 1992. Effects of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 33: 899-906.
7. Vinson JA, Hontz BA. 1984. Phenol antioxidative index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem* 43: 401-403.
8. Kahlos K. 1994. XII. *Inonotus obliquus* (Chaga Fungus): *In vitro* culture and the production of inotodiol, sterols, and other secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 26: 179-198.
9. Shivrina AN. 1967. Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem Abstr* 66: 17271z.
10. Kier L. 1961. Triterpenes of *Poria obliqua*. *J Pharm Sci* 50: 471-474.
11. Kahlos K, Hiltunen R. 1983. Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 92: 220-224.
12. Kahlos T, Zhuangang L, Hiltunen R. 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 96: 33-40.
13. Mizno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kito T, Ukai S, Leclerc S, Meijer L. 1999. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus*. (Pers.:Fe.) PII (Aphylloromyce-tidaeae) *Int J Med Mushrooms* 1: 301-316.
14. Ichimura T, Watanave O, Maruyama S. 1998. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fusconia obliqua*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 575-577.
15. Saitoh A, Sato C, Niiyama K. 1996. *チャガ カバノアナダケの変異原性 抑制効果について*. 道衛研究報 第46集.
16. 星崎 東明 1998. *カバノアナダケ (チャガ)*. 健全社, オレンジ文庫. p 38.
17. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1204.
18. Kim JH, Park JH, Park SD, Choi SY, Seong JH, Moon KD. 2002. Preparation and antioxidant activity of health drink with extract powders from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Korean J Food Sci Technol* 34: 617-624.
19. Leong LP, Shui G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76: 69-75.
20. Osawa T. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf was of Eucalyptus leaves. *Agric Biol Chem* 45: 735-739.
21. Choi Y, Him M, Shin J, Park J, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
22. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
23. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302-306.
24. Cho SY, Han YB, Shin KH. 2001. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 133-137.
25. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner AA. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 24: 407-412.
26. Roberta RE, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an im-

- proved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
27. Wang MF, Shao Y, Li JG, Zhu NQ, Rngarajan M, Lavoie EJ, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
28. Kang WW, Kim GY, Park PS, Park MR, Choi SW. 1996. Antioxidative properties of persimmon leaves. *Food and Biotechnology* 5: 48-53.
29. Kähköne MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja RK, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954-3962.
30. Frenkel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsion. *J Agric Food Chem* 42: 1054-1059.
31. Banni S, Contini MS, Angioni E, Delana G, Dessi MA, Melis MP, Carta G, Corongiu FP. 1996. A novel approach to study linoleic acid autoxidation: importance of simultaneous detection of the substrate and its derivative oxidation products. *Free Radical Research* 25: 43-53.
32. Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq Biol Technol* 40: 97-106.
33. Kandaswami C, Middleton EJr. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In *Free radicals in diagnostic medicine*. Armstrong D, ed. Plenum Pree, New York and London. p 351-376.
34. Ilo M, Moriyama Y, Matsumoto N, Takaki N, Fukumoto M. 1985. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric Biol Chem* 49: 2173-2176.
35. Nakagawas T, Yokozawa T. 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 40: 1745-1750.
36. Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, Sung SK. 1998. Effect of hot water extracts of *Salivamiltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 399-405.

(2004년 12월 17일 접수; 2005년 2월 2일 채택)