

감마선 조사 황기의 기능성 및 화학적 성분에 대한 안정성 평가

정 일 윤

한국원자력연구소 방사선식품·생명공학연구팀

Stability of Functional Properties and Chemical Components of Gamma-Irradiated Astragali Radix

Ill-Yun Jeong

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

Abstract

Stability of functional properties and chemical components of gamma-irradiated Astragali Radix (AR) were investigated to study the application of radiation technology for preservation and hygiene of medicinal herbs. Thus, ethanolic extracts and ethyl acetate fractions were prepared from gamma-irradiated and gamma-non-irradiated AR, respectively. Functional properties were estimated by comparing antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity, lipid peroxidation inhibitory activity) and protective effect against oxidative DNA damage in human lymphocytes. Chemical components were compared by HPLC analysis, comparing with calycosin ($R=15.111$ min), which was isolated from ethyl acetate fraction as a standard material. Their antioxidant activities and protective effects against oxidative DNA damage showed no significant difference at the concentrations tested. HPLC analysis also showed almost same pattern. These results suggest that the functional properties and chemical components of AR are not affected largely by gamma irradiation, and radiation technology can be applied to preservation and hygiene of medicinal herbs.

Key words: Astragali Radix, gamma irradiation, functional properties, chemical components

서 론

황기(Astragali Radix: *Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 중북부 지역 및 유럽에 분포하여 간장보호, 면역촉진, 강심작용, 이뇨작용 등에 그 뿌리를 민간약용으로 많이 이용하여 왔으며, 최근에 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라서 그 수요는 더욱 더 증가될 것으로 보여 진다(1-5).

생약재의 유통을 위한 위생화 기술은 ethylene oxide를 사용한 훈증법이 이용되어 왔지만, 화학물질 잔류 등의 문제로 인하여 이의 대체 기술로서 방사선 조사 위생화 기술이 응용되고 있다(6-11). 방사선 조사 기술은 해로운 병원성 미생물을 함유하는 다양한 유기 오염균을 제거할 수 있기 때문에 식품의 저장 및 살균을 증가시키는데 편리하고 효율적인 방법의 하나이다. 생약재의 방사선 조사는 살균·살충 목적으로 유럽 및 미국 등에서 허가되어 있다. 국내에서는 1990년부터 인삼에 대한 조사식품의 안전성 연구가 수행되어 영양학적, 미생물학적, 약리효능 및 유전독성학적 안전

성이 입증되었으며(12-15), 최근 황기 등을 대상으로 방사선 조사 생약재에 대해 *Salmonella* Typhimurium을 이용한 복귀돌연변이 시험과 Chinese hamster ovary 세포를 이용한 소핵유발시험을 시행하여 유전독성학적 안전성이 보고되었다(16).

이에 본 연구에서는 생약재의 유통을 위한 방사선 조사 위생화 기술의 적용 가능성을 검토하기 위해 방사선 조사 황기의 기능성 및 화학적 성분의 안정성을 검증하고자 하였다. 방사선 조사 황기의 기능성 평가는 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 용매 분획물을 대상으로 DPPH 라디칼 소거활성 및 지질과산화 억제활성을 통한 항산화 시험과 comet assay를 이용한 DNA의 산화적 스트레스에 대한 방어효과를 측정하여 방사선 비조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 용매 분획물과 비교 검증하였다. 또한 화학적 성분의 안정성 평가는 방사선 조사 및 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물을 대상으로 HPLC을 이용하여 비교 분석하였으며, 표준물질로는 ethyl acetate 분획물에서 분리한 calycosin을 사용하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료제조

황기(Astragali Radix: 황기의 뿌리)는 음건 건조된 것으로 서울 경동시장에서 구입하여 실온에 보관하여 시료로 사용하였다. 생약재의 감마선 조사는 한국원자력연구소에 소재 하는 감마선 조사시설(선원: Co-60)을 이용하여 실온에서 시간당 2 kGy의 선량율로 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 감마선 조사 및 비조사 생약재 600 g에 약 5배량의 95% ethanol을 가하여 실온에서 4일간 침지시켜 여과와 원심분리를 거친 후 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 조추출물을 물에 해리시킨 후 ethyl acetate 용매로 분획하여 농축한 후 -70°C에서 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

표준물질의 분리 및 구조동정

황기의 ethanol 추출물에서 분획한 ethyl acetate 용매 분획물로부터 표준물질을 분리하였다. 즉, ethyl acetate 분획물을 silica gel column에 loading한 후 TLC로 monitoring을 병행하면서 chloroform과 methanol 혼합용액으로 용출시켜 분획물을 얻은 후 MCI gel chromatography를 이용하여 순수 단일물질인 calycosin을 표준물질로서 분리하였다. 분리한 표준물질의 구조분석은 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR(Bruker AW-500 spectrophotometer)과 JEOLJMS-700 mass spectrometer를 이용하여 분석하였으며, 녹는점은 Klofler hot-stage apparatus를 사용하여 결정하였다(Table 1).

DPPH 라디칼 소거 시험

DPPH 라디칼 소거활성 시험은 각 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액(99.9% methanol에 용해) 1.8 mL씩을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하여 30분 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거활성은 DPPH의 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였으며, 시료첨가와 비첨가구의 흡광도 감소 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Rat liver microsome의 분리

Sprague-Dawley rat(180~220 g)의 간으로부터 차등 원심분리법으로 microsome을 분리하였으며, 모든 조작은 0~4°C의 저온에서 행하였다. Rat으로부터 간을 적출하여 세척한 후 냉각된 0.9% 생리 식염수에 넣고 2~3회 세척한 후 간 1 g당 9배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 조직분쇄하였다. 4°C, 9,000×g에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 4°C, 105,000×g에서 60분간 초원심 분리하여 microsome 분획을 얻었다. 이것을 50 mM Tris-buffer(pH 7.5)로 희석시키고 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 단백질 정량을 하였다.

Rat liver microsome에서 지질과산화 억제시험

Fe^{2+} /ascorbate 반응계에 의하여 최종 생성된 hydroxyl radical은 지질원인 microsome을 산화시켜 malondialdehyde(MDA)가 생성되는데, 이것을 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 분광학적 방법으로 정량하였다. 즉, Microsome (10 mg protein/mL) 50 μL , 50 mM Tris-buffer(pH 7.5) 750 μL , 시료 50 μL 를 넣은 후 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 2 mM ascorbic acid 혼합액 200 μL 를 넣고 30분간 반응시켰다. 반응용액에 20% TCA 용액 250 μL 를 가하여 vortex한 후 1% TBA 용액 250 μL 를 가하고 100°C에서 15분간 끓인 후 532 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / (\text{Ac} - \text{Ab}) \times 100$$

Ac: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

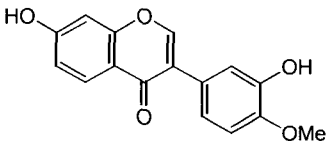
As: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

Ab: 시료 및 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /2 mM ascorbic acid 용액을 첨가하지 않은 blank의 흡광도

Lymphocyte의 분리 및 산화적 스트레스

정상인 남자의 말초혈액을 채취하여 Ficoll-Histopaque gradient 방법으로 림프구를 분리하고 HBSS에 수세한 후 10% fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시켰다. 림프구 배양 시험관에 시료를 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음, 산화적 스트레스를 부가하기 위해 Co-60 감마선을 1 Gy/min의 선량율로 2 Gy 조사하였다. 림프구는 방사선 조사 후 DNA 수복을 차단하

Table 1. Spectral and physical data of calycosin isolated from Astragali Radix

Apparatus ¹⁾	Data	Structure
^1H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) δ	3.89 (s, 3H, OCH ₃), 6.93 (s, 1H), 6.99 (brs, 3H), 7.10 (s, 1H), 8.00 (d, <i>J</i> =8.7 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H),	
^{13}C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz) δ	55.6, 102.1, 111.9, 115.2, 116.4, 116.5, 119.7, 123.3, 124.7, 127.2, 146.0, 147.5, 153.0, 157.4, 162.8, 174.6	
Melting point (°C)	245~247	
Mass spectroscopy	<i>m/z</i> =284 (<i>M</i> ⁺)	

¹⁾ ^1H and ^{13}C NMR experiments were conducted on Bruker AW-500 spectrometer. EIMS was obtained on a JEOLJMS-700 mass spectrometer. Melting point was determined on a Klofler hot-stage apparatus and are uncorrected.

기 위하여 전기영동을 시행하기 전까지 4°C를 유지하였다.

DNA의 산화적 스트레스에 대한 방어효과

Alkali 조건의 단세포 전기영동법(Single cell gel electrophoresis: Comet assay)은 DNA 외가닥 절단과 alkali에 민감한 부위(Apurinic or Apyrimidinic site: AP site)를 민감하게 측정할 수 있기 때문에 유전독성물질을 감지하기 위한 생물학적 표지자로 각광을 받고 있다. 실험은 Singh 등(17)의 방법에 따라 방사선에 의한 혈액 림프구(세포)의 DNA 손상 정도를 측정하기 위하여 세포를 agarose와 혼합하고 이를 slide에 접착한 후 lysis buffer에서 4°C로 1시간 동안 용해시켰다. 용해시킨 slide는 electrophoretic buffer를 이용 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 60 µL의 ethidium bromide(20 µL)로 염색한 후 CCD 카메라가 부착된 형광 현미경을 사용하여 이미지 분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통해 60개의 세포를 선택하여 분석하였다. DNA 손상정도는 tail 길이와 tail내 DNA 파편(fragment)을 수치화시킨 tail moment(TM)로 나타내었으며 TM 값이 증가할수록 DNA가 손상을 많이 받은 것을 의미한다.

$$TM \text{ (tail moment)} = (\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \%DNA}/100$$

HPLC 분석조건

방사선 조사 황기의 화학적 성분의 안정성을 검토하기 위해 HPLC(High performance liquid chromatography)를 이용하여 표준물질을 분리한 ethyl acetate 용매 분획물에 대상으로 방사선 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물과 비교 검증하였다(Table 2).

결과 및 고찰

Calycosin의 구조분석

비조사 황기의 ethyl acetate 분획물에서 분리한 calycosin의 구조분석은 분광학적 기기 및 물리적 성질을 비교하여 동정하였다. ¹H NMR에서 B ring의 3H 분에 해당하는

Table 2. Conditions of HPLC analysis

Item	Methods
Column	Symmetry C18, 5 µm, 3.9×150 mm
Temperature	22°C
Mobile phase	A=0.1% phosphoric acid in H ₂ O B=acetonitrile
Gradient elution	10 to 50% B (28 min), hold at 50% B (2 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Standard concentration	1.0 mg/mL
Injection volume	10 µL
Detector	Waters 996 PDA detector, UV@254 nm

methoxy group의 단일 peak가 3.89 ppm에서 관찰되었고 6.93 ppm에서는 C ring의 1H에 해당하는 단일 peak가 나타났으며 C ring의 2H와 B ring의 1H에 해당하는 peak는 6.99 ppm에서 다소 넓은 형태로 나타났다. 나머지 B ring의 2H는 7.1과 8.0 ppm에서 각각 단일 peak와 이중 peak로 나타났고 A ring의 1H는 가장 저자장 영역인 8.3 ppm에서 단일 peak로 관찰되었다. ¹³C NMR에서 16개의 탄소 수가 관찰되었고 녹는점은 245~247°C이었으며 질량분석에 의한 분자량은 284를 기록하였다. 이상의 결과를 문헌치(18)와 비교하여 calycosin으로 동정하였다.

DPPH 라디칼 소거효과

화합물이 DPPH 라디칼에 전자를 공여함으로써 라디칼 소거효과를 측정한 Blois(19)의 방법에 따라 방사선 조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 용매 분획물에 대해 전자 공여능을 측정하여 비조사 황기와 비교 검토하였다(Figs. 1, 2). 조사 및 비조사 황기의 ethanol 추출물은 100,

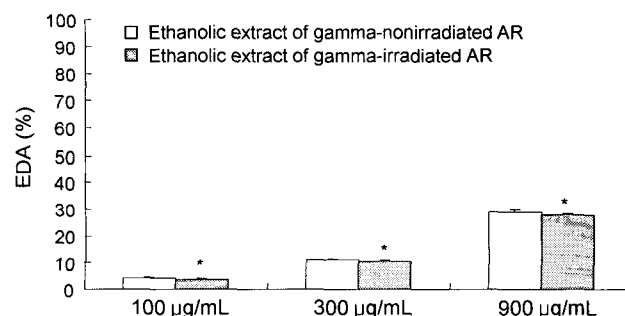


Fig. 1. Comparison of DPPH radical scavenging activity between ethanolic extracts of gamma-irradiated and nonirradiated AR.

EDA (electron donating ability)=[(1 - absorbance of sample treatment at 517 nm/absorbance of control treatment at 517 nm) × 100]. Each bar represents mean ± SD (n=3).

*p>0.05 compared to ethanolic extracts of gamma-nonirradiated AR.

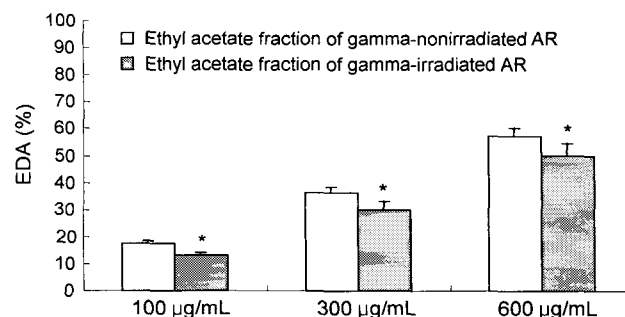


Fig. 2. Comparison of DPPH radical scavenging activity between ethyl acetate fractions of gamma-irradiated and non-irradiated AR.

EDA (electron donating ability)=[(1 - absorbance of sample treatment at 517 nm/absorbance of control treatment at 517 nm) × 100]. Each bar represents mean ± SD (n=3).

*p>0.05 compared to ethyl acetate fractions of gamma-non-irradiated AR.

300, 900 µg/mL의 농도 변화에서 각각 4~28% 및 4~29%의 라디칼 소거효능을 보였으며 조사 및 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물은 100, 300, 600 µg/mL의 농도에서 각각 13~50% 및 17~57%의 라디칼 소거효능을 나타냈다.

지질과산화 억제효과

시험관 내에서 Fenton 반응에 의해 유도되는 rat liver microsomes의 과산화에 대한 억제효과를 측정하여 방사선 조사 및 비조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 용매 분획물과 비교하였다(Figs. 3, 4). 조사 및 비조사 황기의 ethanol 추출물에서 지질과산화 억제효율은 10, 30, 90 µg/mL의 농도에서 17~55% 및 16~58%를 보였으며 조사 및 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물간에는 10, 30, 60 µg/mL의 농도에서 50~85% 및 52~87%의 지질과산화 억제효능을 나타냈다.

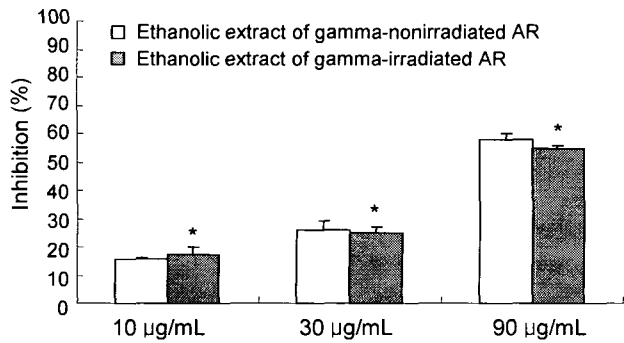


Fig. 3. Comparison of lipid peroxidation inhibitory activity between ethanolic extracts of gamma-irradiated and non-irradiated AR.

Inhibition (%) = [(1 - absorbance of sample treatment at 532 nm / absorbance of control treatment at 532 nm) × 100]. Each bar represents mean ± SD (n=3). *p > 0.05 compared to ethanolic extracts of gamma-nonirradiated AR.

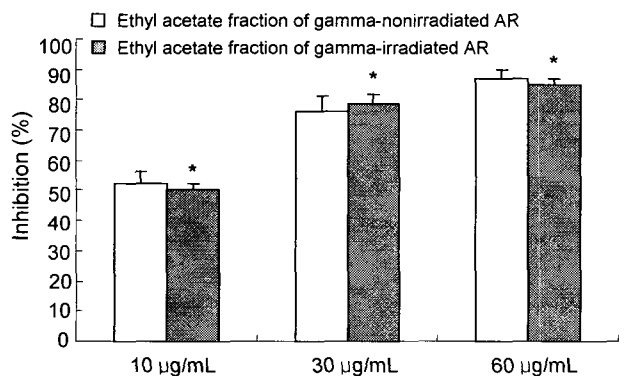


Fig. 4. Comparison of lipid peroxidation inhibitory activity between ethanolic extracts of gamma-irradiated and non-irradiated AR.

Inhibition (%) = [(1 - absorbance of sample treatment at 532 nm / absorbance of control treatment at 532 nm) × 100]. Each bar represents mean ± SD (n=3). *p > 0.05 compared to ethyl acetate fractions of gamma-non-irradiated AR.

DNA 방어효과

사람 림프구에서 방사선 조사에 따른 DNA의 산화적 손상에 대한 방어효과를 측정하여 방사선 조사 및 비조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 용매 분획물과 비교하였다(Figs. 5, 6). 조사 및 비조사 황기의 ethanol 추출물은 10 µg/mL 농도에서 24% 및 55%를 50 µg/mL에서는 20% 및 46%의 DNA의 산화적 손상 방어효과를 보였다. 또한 조사 및 비조사 황기의 ethyl acetate 용매 분획물도 동일농도에서 51% 및 58%와 38% 및 54%의 방어효과를 나타냈다.

HPLC 분석

방사선 조사 황기에 대한 화학적 성분의 변화 유무를 관찰하기 위해 ethyl acetate 용매 분획물로부터 calycosin을 표준물질로서 분리하여 방사선 조사 및 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물에 대한 정성분석을 실시하였다(Fig. 7). Caly-

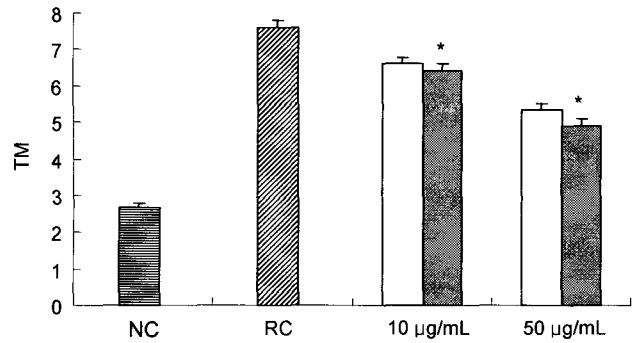


Fig. 5. Comparison of protective effect between ethanolic extracts of gamma-irradiated and nonirradiated AR against gamma-irradiated DNA damage in human lymphocyte.

NC: normal control, RC: radiation control. □ Ethanolic extract of gamma-nonirradiated AR, ■ Ethanolic extract of gamma-irradiated AR. TM (tail moment) = (tail mean - head mean) × tail %DNA/100. *p > 0.05 compared to ethanolic extracts of gamma-nonirradiated AR.

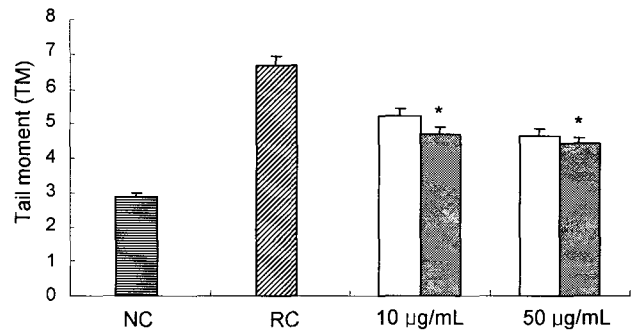


Fig. 6. Comparison of protective effect between ethyl acetate fractions of gamma-irradiated and nonirradiated AR against gamma-irradiated DNA damage in human lymphocyte.

NC: normal control, RC: radiation control. □ Ethyl acetate fraction of gamma-nonirradiated AR, ■ Ethyl acetate fraction of gamma-irradiated AR. TM (tail moment) = (tail mean - head mean) × tail %DNA/100. *p > 0.05 compared to ethyl acetate fractions of gamma-non-irradiated AR.

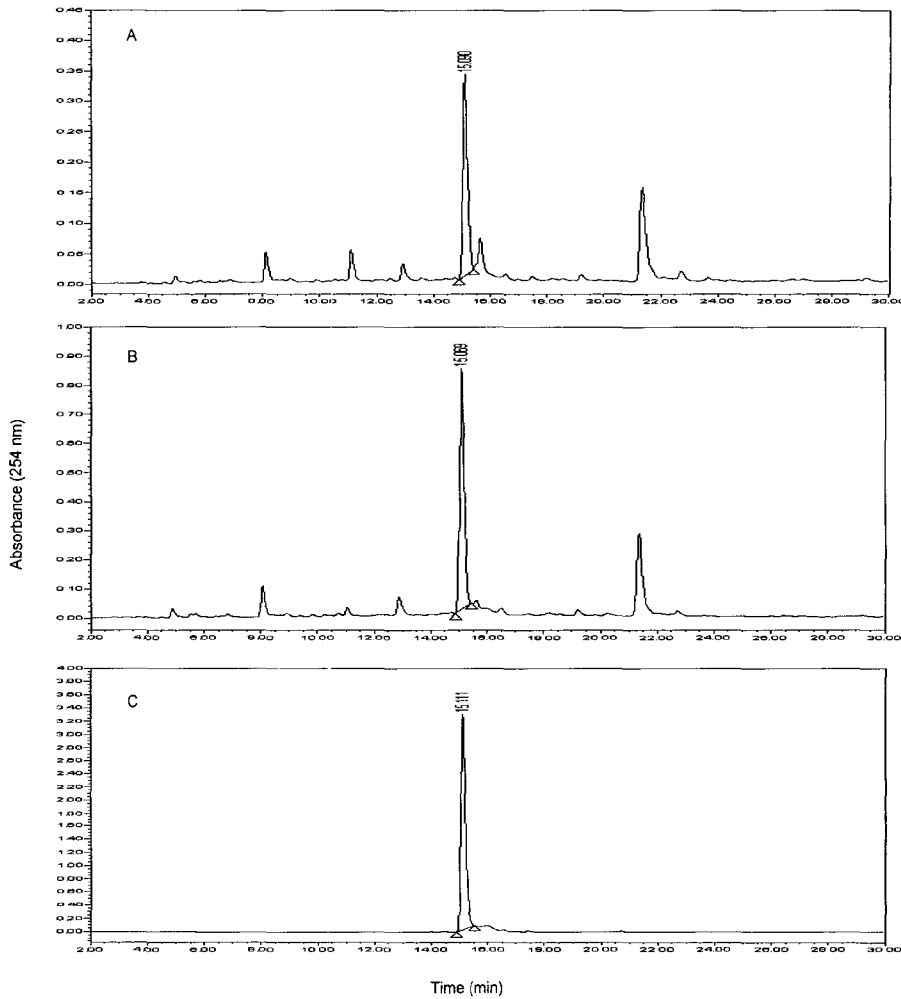


Fig. 7. HPLC analyses between ethyl acetate fractions of gamma-irradiated and nonirradiated AR. (A) Ethyl acetate fraction of gamma-irradiated AR; (B) Ethyl acetate fraction of gamma-nonirradiated AR; (C) Calycosin as standard.

cosin의 RT(retention time)은 15.111분에서 감지되었고 방사선 비조사 및 조사 황기의 ethyl acetate 분획물에 함유되어 있는 calycosin도 거의 일치하는 15.090 및 15.069에서 각각 RT value를 보였으며 다소 약하게 감지된 다른 peak들도 거의 동등한 양상을 보여 주었다.

요 약

방사선 조사 황기(Astragali Radix)에 대한 기능성 및 화학적 성분에 대한 안정성을 평가하였다. 기능성 평가시험으로서 방사선 조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성은 4~28% 및 13~50%를 각각 보였으며 비조사 황기는 4~29% 및 17~57%로서 거의 동등한 라디칼 소거활성을 보였다($p>0.05$). 지질과 산화 억제시험에서 방사선 조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 분획물은 각각 17~54% 및 50~84%의 억제활성을 보였고 비조사 황기는 각각 16~58% 및 52~86%를 나타냄으로써 지질과산화 억제활성도 방사선 조사에 거의

영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다($p>0.05$). Comet assay를 이용한 DNA 방어효과 시험에서 방사선 조사 황기의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 분획물은 24~55% 및 49~58%였고 비조사 황기는 각각 20~46% 및 38~54%로써 거의 동등한 DNA의 산화적 경감효과를 보였다($p>0.05$). 화학적 성분에 대한 안정성 평가시험인 HPLC 분석시험에서 방사선 조사 황기의 ethyl acetate 분획물은 비조사 황기의 ethyl acetate 분획물과 거의 대등한 peak 양상을 나타냄으로써 화학적 성분의 안정성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 방사선 조사 황기에 대한 본 연구의 결과와 이전의 유전독성학적 안전성 결과를 종합하여 볼 때 부가적인 실험이 동반된다면 실제적으로 위생화를 위한 방사선 조사 품목의 하나로서 그 적용 가능성이 시사되었다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Baek NI, Kim SY, Kyung JS, Park KH. 1996. Isolation of anti-hepatotoxic from the root of *Astragalus membranaceus*. *Kor J Pharmacogn* 27: 111-116.
2. Kim JS, Kim CS. 1997. A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* (II). *Kor J Pharmacogn* 28: 75-79.
3. Lee YJ, Chung KH. 2004. A study on a morphological identification of *Astragalus* root. *Kor J Herbology* 19: 61-68.
4. Kim EJ, Oh OJ, Lee SK, Yang KS. 2001. Inhibitory effect of *Astragali Radix* on COX-2 activity. *Kor J Pharmacogn* 32: 311-315.
5. Song BK, Lee EJ, Kim HK, Jin SD, Kim SJ, Kim DH. 1998. Effects of *Astragali Radix* on the function of murine immunocytes *in vivo* and *in vitro*. *Kor J Herbology* 13: 115-128.
6. Fridovich I. 1974. Superoxide radical and the bacterial action of phagocytes. *J Med* 290: 624-625.
7. McCord JM. 1974. Free radical and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531.
8. Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
9. Lynch RE, Fridovich I. 1978. Effect of superoxide on erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253: 1838-1845.
10. Freeman BA, Grapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
11. IAEA/ICGFI. 2000. 2000 World list for clearance. IAEA website www.iaea.org/icgfi.
12. Sung HS, Park MH, Lee KS, Cho HO. 1982. Studies on the preservation of Korean ginseng by irradiation: Part I. Effect of gamma irradiation on the physicochemical properties of ginseng powder. *Korean J Food Sci Technol* 14: 136-140.
13. Sung HS, Park MH, Lee KS, Cho HO. 1982. Studies on the preservation of Korean ginseng by irradiation: Part II. Effect of gamma irradiation on the physicochemical properties of ginseng powder during the storage. *J Korean Agric Chem Soc* 25: 105-109.
14. Ha KW, Jung HK, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Jung SC, Choi BY, Kim YM, Kim PS, Moon HH. 1994. Studies on the genotoxicity of the gamma-irradiated *Panax ginseng radix* *in vitro* and *in vivo*. *J Fd Hyg Safety* 9: 67-74.
15. Han BH, Han YN, Ryu JH, Kim YC, Kang YH, Kwon JH, Chin K. 1995. Component profile analysis of irradiated Korean white ginseng powder. *Korean J Ginseng Sci* 19: 138-143.
16. Park HR, Ham YH, Jung UH, Jeong IY, Jo SK. 2002. Genotoxicological safety of hot water extracts of the γ -irradiated *Astragali Radix*, *Atractylodes Rhizoma*, and *Cimicifugae Rhizoma* *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 910-916.
17. Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -ray. *J Radiat Biol* 66: 563-569.
18. Kamnaing P, Fanso Free SNY, Nkengfack AE, Folefoc G, Fomum ZT. 1999. An isoflavan-quinon and a flavonol from *Millettia laurentii*. *Phytochemistry* 51: 829-832.
19. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.

(2004년 12월 3일 접수; 2005년 1월 27일 채택)