J Korean Soc Food Sci Nutr
39(2), 193~202(2010)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2010.39.2.193

더덕(*Codonopsis lanceolata*) 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo* 항산화 효과

김수현[1] · 정미자[2] · 장해동[3] · 함승시[1†]

[1]강원대학교 생명공학부
[2]강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬 바이오)
[3]한남대학교 식품영양학과

Antioxidative Activities of the *Codonopsis lanceolata* Extract *in vitro* and *in vivo*

Soo-Hyun Kim[1], Mi Ja Chung[2], Hae-Dong Jang[3], and Seung-Shi Ham[1†]

[1]Dept. of Food Science and Biotechnology, Division of Biotechnology, School of Biosceince and Biotechnology, and [2]The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea
[3]Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

Abstract

In vitro **activities of *Codonopsis lanceolata* (CL) 70% ethanol extract and its fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water) were examined by total polyphenol content, reducing power, 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assays. The ethyl acetate fraction from CL ethanol extract (CLEA) showed the highest total polyphenol content (22.7 mg/g) among five fractions, and also exhibited an excellent reducing power (0.42~1.27 at 250~1,000 μg/mL). CLEA at 100~400 μg/mL concentrations had 27.7~70.3% of ABTS radical scavenging activity and the highest DPPH radical scavenging activity (81.6% at 400 μg/mL). CLEA had dominantly higher $ORAC_{ROO\cdot}$ activity compared to other fractions. CLEA and butanol fraction had significantly higher $ORAC_{OH\cdot}$ activities than 70% ethanol extract, hexane, chloroform and water fractions. The CLEA exhibited the highest antioxidant activity in CL 70% ethanol extract and its fractions. Thus, effect of CLEA treatment on antioxidant gene expression under the oxidative stress conditions by a high fat diet in animal model was studied by microarray and RT-PCR methods. The 31 antioxidant genes were expressed but the genes were not up-regulated at least a two-fold by CLEA treatment. We concluded that CLEA does not have an indirect antioxidant effect but a direct antioxidant effect by up-regulation of antioxidant genes in high fat diet-induced obese mice.**

Key words: antioxidant activity, antioxidant gene, *Codonopsis lanceolata*, microarray, oxidative stress

서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 미토콘드리아와 같은 세포 내 기관의 정상적인 대사 및 세포질 내 일부 효소들에 의하여 자연적으로 생성되며, 세포 내에 적당량이 존재할 경우 여러 가지 세포반응을 조절할 수 있는 신호분자가 된다(1). 하지만 과량의 활성산소종은 DNA 분절과 단백질의 불활성화 및 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 생체기능을 저하시킴으로써 노화를 유발할 뿐만 아니라 류마티스성 관절염, 당뇨병, 심장병, 동맥경화, 암 등과 같은 여러 질환의 원인으로 잘 알려져 있다(1). 따라서 인체에 부작용이 없는 약용식물 추출물이 간접적으로 생체 내 항산화 방어시스템을 증가시키거나 직접적으로 ROS를 소거시키는 효과가 있다면 그 추출물은 다양한 질병을 예방하기 위한 기능성 소재로 사용될 수 있을 것이다.

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 예로부터 독특한 맛과 향으로 인해 여러 가지 조리 방법을 통하여 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으며 한방에서는 폐 기운을 돋워주고 가래를 없애주는 약제로 사용되어 강장, 해열, 거담, 해독 및 배농 등의 질병치료의 목적으로 사용되고 있다(2). 더덕의 주성분은 saponin, inulin과 flavonoid 등으로 알려져 있고(3), 혈청 지질의 감소효과, 면역력 증가 및 더덕 에탄올 추출물과 더덕 부위별 세포벽 물질의 항산화효과가 보고되었다(4-9). 특히 Won과 Oh(10)는 더덕껍질과 더덕육질을 섭취시킨 흰쥐의 간과 혈액에서 생체 내 항산화 방어 시스템 중 glutathione peroxidase(GPx)와 glutathione reductase(GR)의 활성이 증가되었고, 항산화 효과에 의한 지질 수준 저하가 확인되었다고 보고하였다. 본 연구팀은 더덕 에틸아세테이트

†Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

분획물이 인간 간세포 HepG2에서 주요 항산화 유전자인 catalase(CAT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 그리고 metallothionein(MT)을 발현시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다는 것을 보고한 바 있다(11).

고지방식이는 산화적 스트레스를 유발시키는 것으로 알려져 있다(12). 따라서 본 연구에서는 더덕의 70% 에탄올 추출물과 이들 추출물의 6개의 분획물들의 항산화 효과를 측정한 후, 고지방식이에 의해 산화적 스트레스가 유발된 마우스에게 가장 항산화 효과가 높은 에틸아세테이트 분획물의 동결건조 분말을 급여했을 때 항산화 유전자 발현에 미치는 영향력을 알아보았다. 본 연구의 목적은 더덕의 *in vitro*, *in vivo* 항산화 효과를 검토하여, 산화적 스트레스에 기인하여 유발되는 다양한 질병을 예방 및 개선할 수 있는 천연 기능성 소재를 발굴하는 것이다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 실험에 사용한 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 2007년 구룡제약(주)(Cheolwon, Korea)으로부터 분말형태로 제공받아 시료 중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하고 80°C에서 8시간 동안 3회 추출하였다. 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 다음 농축물을 얻었다. 70% 에탄올로 추출하여 얻은 농축물을 용매의 극성 차이에 따라 분리를 행하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 층의 순서로 다섯 가지 분획물을 제조하였다. 분리된 각각의 용매 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

총 페놀 함량 측정

더덕 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 총 페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법(13)을 응용하여 측정하였다. 즉, 시료를 1 mg/mL로 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 5 mL를 만든 후 Foline-Ciocalteau's phenol regent 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 3분간 방치하였다. 그리고 10% Na_2CO_3 포화용액 1 mL 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 상등액을 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 카페인산(caffeic acid)을 0~100 μg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하였으며, 표준 검량곡선으로부터 추출물의 총 페놀 함량을 계산하였다.

환원력 측정

더덕 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 환원력은 Oyaizu 등(14)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 농도별 시료 1 mL, 인산 완충액(200 mM, pH 6.6) 그리고 1% potassium ferricyanide를 1 mL씩 차례로 가하여 섞은 후 50°C에서 20분간 반응시켰다. 10% TCA용액 1 mL를 가하여 3,383×*g*에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상징액 2 mL에 증류수 1 mL와 0.1% ferric chloride 1 mL를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid를 이용하여 시료의 환원력을 비교하였으며 시료의 환원력은 흡광도 값으로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거활성 측정

총 항산화력은 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS) cation decolorization assay 방법(15)에 의하여 측정하였다. 즉, ABTS 7.4 mM과 potassium persulfate 2.6 mM을 12~16시간 암소에 방치하여 $ABTS^{\cdot+}$ 이온을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS용액 1 mL에 시료 500 μL을 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 흡광도의 변화를 분광광도계를 이용하여 측정하였고(GE healthcare, Pischaway, NJ, USA) 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

DPPH free radical 소거활성 측정

2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) free radical 소거활성은 Choi 등(16)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 여러 농도의 시료를 4 mL의 메탄올에 녹여 1.5×10^{-4} M DPPH 용액(메탄올) 1 mL를 첨가한 후, 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성비교를 위하여 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였으며, 시료 무첨가구에 대한 첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)에 의한 항산화 활성 측정

ORAC assay는 식품이나 음료의 total antioxidant capacity(TAC)를 양적으로 측정하여 항산화 활성을 평가하기 위한 도구로 널리 활용되는 방법으로 free radical에 의해 유도되는 손상으로부터 시료에 의한 보호 능력을 측정하는 것이다(17). ORAC를 이용한 항산화 활성 측정은 peroxyl radical scavenging capacity($ORAC_{ROO\cdot}$) assay(18)와 hydroxyl radical scavenging capacity($ORAC_{OH\cdot}$) assay(19)를 사용하였다. $ORAC_{ROO\cdot}$ assay에는 40 nM fluorescein과 5 mM 2,2′-azobis[2-amidinopropane]dihydrochloride(AAPH)를 사용하였고, $ORAC_{OH\cdot}$ assay에는 40 nM fluorescein과 220 mM H_2O_2/5 μM $CuSO_4$을 사용하여 GENios fluorescence plate reader(Tecan, Salzburg, Austria)로 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광을 측정하였다. $ORAC_{ROO\cdot}$의 결과는 vitamin E 수용성유도체인 trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonyl acid) 1 μM에 의해 보호된 curve area와 비교하여 계산하였으며, $ORAC_{OH\cdot}$의 결과는 시료에 의해 얻은 curve area에서 fluorescein에 H_2O_2-$CuSO_4$를 첨가하였을 때 얻은 curve area를 뺀 net area로 나타내었다.

실험동물 및 식이

5주령의 수컷 C57BL/6J를 샘타코(n=20)(Ohsan, Korea)에서 구입하여 일주일간 적응시킨 후 모두 5주 동안 고지방 식이로 비만을 유도하였다. 5주 후 난괴법에 의거하여 2개의 군으로 분류하였다. 즉 고지방식이만을 섭취한 군[HF diet(HFD), n=10], 125 mg/kg 더덕 에틸아세테이트 분획물의 동결건조 분말을 기본식이에 지방(beef tallow)을 40% 수준으로 조정한 고지방 식이에 혼합 급이한 군(HFD+CLEA, n=10)으로 분류하여 4주간 실험을 진행하였다. 실험기간 동안 음수와 식이는 *ad libitum*으로 급여하였으며, 사육장 온도는 21±2°C, 습도 50±10%에서 12시간 주기로 명암 조절하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회(Kangwon National University Institutional Animal Care and Use Committee, KIACUC)의 승인 하에 수행하였다. 실험 식이를 실시한 4주 후 Avertin(20)으로 마취한 후 간을 적출하여 PBS(phosphate-buffered saline)에 헹군 후 액체질소로 급속냉동 시켰다. 급속 냉동된 조직은 -80°C에 실험 전까지 보관하였다.

RNA 분리

냉동된 간 조직(약 0.1 g)에 TRIzol 용액 1 mL를 넣고 균질화한 후 0.2 mL의 chloroform을 넣고 15초간 잘 흔든 다음 실온에서 2~3분간 더 반응시켰다. 4°C에서 15분간 원심분리(12,000×*g*)한 후 상층액을 잘 분리하여 다른 튜브로 옮긴 후 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리(12,000×*g*, 4°C, 10 min) 후 상층액을 제거하였고, 75% 에탄올 1 mL를 넣어 원심분리(12,000×*g*, 4°C, 5 min) 하였다. 상층액을 버리고 에탄올을 완전히 제거한 후 RNase-free water로 RNA를 녹인 후 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 28S ribosomal RNA(rRNA)와 18S rRNA의 peak를 확인하였고, rRNA의 density 비율은 rRNA ratio(28S/18S)로 나타내었고, 비율이 1.6 이상일 때 다음 실험진행을 계속하였다.

Microarray를 위한 시료 준비

Total RNA 2 μg과 T7 oligodT primer를 총부피 12 μL가 되게 하여 섞었다. 그 혼합물을 70°C에서 10분간 반응시키고 5분 동안 얼음위에서 냉각시켰다. 2 μL 10X first-stand buffer, 4 μL 5 mM dNTP mix, 1 μL RNase inhibitor(20 U/μL), 1 μL Superscript™ II RNase H⁻ reverse transcriptase(200 U/μL)를 혼합물에 넣어 최종 부피 20 μL가 되게 하였다. 반응 혼합물을 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다. Second-stand cDNA를 합성하기 위해, 10 μL 10X second-stand buffer, 63 μL nuclease free water, 4 μL 5 mM dNTP, 2 μL DNA polymerase mix(20 U/μL) 그리고 1 μL RNase H(2 U/μL)를 20 μL의 혼합물에 더하였다. 그 반응 혼합물 16°C에 2시간 동안 반응시켰다. dsDNA를 정제한 다음 최종 부피가 14 μL가 되도록 nuclease free water를 더하였다. 4 μL 10X reaction buffer, 12 μL ATP, CTP, GTP mix(25 mM), 3 μL UTP(50 mM), 3 μL amino ally UTP 그리고 4 μL T7 enzyme mix를 14 μL dsDNA 용액에 더했다. 반응 혼합물은 37°C에 14시간 동안 반응시킨 후 cRNA를 정제하였다. cRNA 회수율은 260 nm에서 UV 흡광도를 측정함으로써 정량하였다. 대조군과 실험군에서 얻은 3 μg의 cRNA에 Cy-Dye(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) 즉, Cy3(대조군)와 Cy5(실험군)를 표지시켰다. Cy-dye를 붙인 cRNA를 hybrization를 위하여 100과 200 bases 사이의 크기로 조각을 내었다.

Array hybridization

잘라진 cRNA(표적)를 Agilent oligo microarray의 hybrization를 위하여 사용하였다. 잘려진 표적은 Agilent의 In site Hybridization kit에 제공된 2X hybridization buffer에 더해졌다. Hybridization 용액은 Agilent oligo microarray(Agilent Whole Mouse Genome Microarray 44K)에 결합시킨 다음 microarray를 60°C에서 16시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 후 microarray를 wash solution I(6X SSC, 0.00005% Triton-X 102)로 상온에서 10분간 간헐적으로 진탕하여 세척한 다음 wash solution II (0.1XSSC, 0.0005% Triton-X 102)로 4°C에서 10분간 세척한 후 건조하였다.

Microarray 결과 분석

GenePix 4000B scanner(Axon Instruments, San Diego, CA, USA)를 이용하여 scan하여 image를 얻었고, 그 영상자료는 GenePix v6.0(Axon Instruments)을 이용하여 결과를 얻었다.

RT-PCR

2 μg total RNA, 1 μL oligo(dT)$_{15}$ primer(500 μg/mL), 1 μL dNTP mix(10 mM each)를 PCR 튜브에 넣은 후 RNase-free water로 최종부피 12 μL가 되도록 조정하였다. 65°C에서 5분간 반응시킨 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 5X first-stand 완충액 4 μL, DTT(Dithiothreitol, 100 mM) 2 μL, RNase-free water 1 μL 및 Superscript™ II Reverse Transcriptase(Invitrogen) 1 μL를 첨가한 후 섞었다. 그 혼합물은 42°C에서 50분간 역전사에 의해 cDNA를 만들었고 70°C에서 15분간 반응시켜 역전사 효소의 활성을 정지시켰다.

각 유전자의 발현을 알아보기 위해 PCR을 실시하였고, 사용한 primer 염기서열과 반응조건은 Table 1, 2와 같다. PCR 최종 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에 20분간 전기영동한 후 image analysis workstation(Slimline™ series, Spectra Services Inc., Ontario, NY, USA)을 이용하여 image를 얻었다. 밴드의 강도는 SigmaGel(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 소프트웨어에 의해 측정하였다.

Table 1. Primers used for PCR

Genes	Primer	Sequence
SOD1	Forward	5′-TGAAAGCGGTGTGCGTGCTGAAG-3′
	Reverse	5′-GGAATGCTCTCCTGAGAGTGAGA-3′
SOD2	Forward	5′-GGCCAAGGGAGATGTTACAA-3′
	Reverse	5′-CTTATTGAAGCCAAGCCAGC-3′
MT1	Forward	5′-TCTCGGAATGGACCCCAACT-3′
	Reverse	5′-TTTACACGTGGTGGCAGCGC-3′
MT2	Forward	5′-TCTCGTCGATCTTCAACC-3′
	Reverse	5′-GGCTTCTACATGGTCTATTTAC-3′
GSTa1	Forward	5′-AAGATGGGAATTTGATGTTTGACC-3′
	Reverse	5′-TTCTCTTTGGTCTGGGGGACA-3′
GSTu1	Forward	5′-TGGTTTGCAGGGGACAAGGT-3′
	Reverse	5′-TCCAGTGGGCCATCTTTGAA-3′
GSTpi	Forward	5′-GCCGCTCTTTGGGGCTTTAT-3′
	Reverse	5′-CCCTGGTTCTGGGACAGGAG-3′
β-actin	Forward	5′-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3′
	Reverse	5′-AGGTCTTTACGGATGTCAACG-3′

Abbreviations: SOD1=Cu/Zn superoxide dismutase, SOD2=Mn superoxide dismutase, MT=metallothionein, GST=glutathione-S-transferase.

Table 2. Amplification conditions for PCR (°C)

Gene	SOD1	SOD2	MT1	MT2	GSTa1	GSTu	GSTpi	β-actin
Initial denaturation	94	94	94	94	95	95	95	94
Further denaturation	94	94	94	94	95	95	95	94
Annealing	50	50	57	45	52	52	52	50
Extension	72	72	72	72	72	72	72	72
Final extension	72	72	72	72	72	72	72	72
Cycle	23	22	26	24	24	20	20	20

Abbreviations: SOD1=Cu/Zn superoxide dismutase, SOD2=Mn superoxide dismutase, MT=metallothionein, GST=glutathione-S-transferase.

통계처리

In vitro 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균 차의 통계적 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다. *In vivo* 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad InStat(GraphPad InStat Version 3.00, 2003) 통계 package를 이용하여, 대조군과 처리군 간의 평균차의 통계적 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

더덕 70% 에탄올 추출물 및 그 분획물들의 총 페놀 함량은 Table 3과 같다. 70% 에탄올 추출물은 3.1 mg/g이었는데 에틸아세테이트 분획물의 경우 22.7 mg/g으로 6개의 실험시료 중 월등히 높은 페놀 함량을 나타내었다. 클로로포름 및 부탄올 분획들의 총 페놀 함량이 각각 9.4, 7.0 mg/g이었다. 물 분획물은 2.1 mg/g으로 가장 낮은 총 페놀 함량을 나타내었다.

Table 3. Total phenol content of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata* (mg/g)

	Content
70% ethanol extract	3.10±0.05[1)b2)]
Hexane fraction	4.25±0.12[c]
Chloroform fraction	9.43±0.35[e]
Ethyl acetate fraction	22.74±0.47[f]
Butanol fraction	7.00±0.34[d]
Water fraction	2.08±0.01[a]

[1)]Values are mean±SD (n=3).
[2)]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

페놀성 물질은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 식물성 식품에 떫은맛과 쓴맛 등 고유한 맛을 내게 하며(21), phenolic hydroxyl기가 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하여 항산화 및 항암 등의 다양한 생리활성을 나타낸다(22). 특히 홍경천, 꾸지뽕나무, 감초, 고삼 등의 식물에서 항산화, 항균 기능성 물질을 분리 동정한 결과(23-25) 대부분 페놀계 물질들로 나타났다는 보고가 있다.

Choi(26)는 잔대(*Adenophora triphylla*) 70% 에탄올 추출물과 그 분획물들에 대한 총 페놀 함량을 실험한 결과 70% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 2.5 mg/g이며 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 10.0 mg/g이었으며, 70% 에탄올 추출물 그리고 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물들 중 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 총 페놀 함량을 나타내었다고 보고하였다. 본 실험결과 더덕의 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물은 잔대보다는 높은 페놀 함량을 나타내었으며, 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 총 페놀 함량을 가지고 있다는 것과도 일치하였다. Kang(4)은 더덕 육질과 껍질의 항산화 활성이 총 페놀 함량이 증가함에 따라 대체로 증가하였다고 보고하였고, 이 항산화 활성은 페놀성 화합물 중에 vanillin, vanillic acid, ferulic acid 등의 함량과 연관되어 있다고 추정하였다. 따라서 더덕 에틸아세테이트 분획물의 가장 높은 총 페놀 함량은 항산화 활성에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

환원력

더덕 추출물 및 그 분획물들의 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원시키는 능력을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 일반적으로 활성 산소는 자동산화 반응으로 연쇄적으로 발생하기 때문에 체내에서는 항산화제가 자동산화 반응 중에 생성되는 자유라디칼에 수소 원자를 공여함으로써 그 반응을 종결시킨다. 이와 같이 전자를 주는 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 되는데 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도 수치가 높게 나타난다. 더덕 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 농도가 증가할수록 환원력이 증가하였으며 더덕 에틸아세테이트 분획물의 농도가 250, 500, 750 및 1,000 μg/mL일 때 각각의 흡광도 값이 0.42, 0.74, 1.01 및 1.27로 다른 분획물에 비하여 가장 높은 환원력을 나타내었고 그 다음으로 클로로포름 분획물이 같은 시료농도에서 각각 0.16, 0.28, 0.36 및 0.45의 환원력을 나타내었다.

Chung 등(27)은 칡에 다량 함유된 puerarin과 puerarin glycosides이 환원력을 가지고 있고, 실험에 사용된 가장 고농도인 0.5 mM purarin과 puerarin glycosides보다 500 μg/mL의 더덕 에틸아세테이트 분획물이 더 높은 흡광도를 나타내었고 모두 농도 의존적인 경향이 있음을 보여 주었다. Purarin, puerarin glycosides 및 더덕 에틸아세테이트 분획물 모두 양성 대조물질로 사용된 ascorbic acid보다는 현저히 낮은 환원력을 나타내었다(27).

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거능을 이용한 더덕의 상대적인 항산화력은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 라디칼이 더덕 내의 항산화력 물질에 의해 제거되면서 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정법으로 이는 hydrogen-donating antioxidants와 chain breaking antioxidants를 측정할 수 있고 aqueous phase 및 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이 특징이다(28).

더덕 추출물 및 그 5개의 분획물들의 ABTS 라디칼 소거활성을 알아본 결과를 Table 5에 나타내었다. 클로로포름과 에틸아세테이트 분획물들은 70% 에탄올 추출물, 헥산, 부탄올 그리고 물 분획물들보다 현저히 높은 ABTS 라디칼 소거작용을 나타내었다. 400 μg/mL에서는 에틸아세테이트 분획물이 실험된 모든 시료들 중 가장 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었으나 양성 대조물질로 사용한 ascorbic acid보다는 현저히 낮았다.

페놀 함량이 높았던 에틸아세테이트와 클로로포름 분획물이 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타냄으로써 페놀 함량과 항산화효과가 깊은 연관성을 지니고 있다는 기존의 연구 결과(29,30)와 동일한 경향을 나타내었다. Kim 등(31)은 증숙하지 않은 수삼의 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성이 12.2%였으나 증숙 횟수가 증가할수록 ABTS 라디칼 활성이 증가하여 9회 증숙하였을 때 68.3% ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다고 보고하였는데 이는 400 μg/mL의 더덕 클로로포름 분획물보다 높았고, 에틸아세테이트 분획물보다는 낮았다.

DPPH 라디칼 소거활성

자유 라디칼은 산화에 의해 형성된 화학적 물질로서 항산

Table 4. Reducing power of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata* (Absorbance)

	Concentration (μg/mL)			
	250	500	750	1000
70% ethanol extract	0.07±0.00[1)b2)]	0.11±0.00^{cd}	0.14±0.00^{f}	0.18±0.00^{h}
Hexane fraction	0.07±0.00^{b}	0.11±0.00^{cd}	0.16±0.00^{g}	0.20±0.00^{i}
Chloroform fraction	0.16±0.01^{g}	0.28±0.00^{k}	0.36±0.00^{m}	0.45±0.02^{o}
Ethyl acetate fraction	0.42±0.01^{n}	0.74±0.01^{p}	1.01±0.02^{q}	1.27±0.01^{r}
Butanol fraction	0.12±0.00^{de}	0.19±0.00^{j}	0.26±0.00^{j}	0.34±0.01^{k}
Water fraction	0.05±0.00^{a}	0.07±0.00^{b}	0.10±0.00^{c}	0.13±0.00^{e}
Ascorbic acid	50	100	150	200
	0.57±0.01	1.04±0.01	1.47±0.04	2.27±0.09
	250	500	750	1000
	2.28±0.87	2.28±0.09	2.27±0.10	2.28±0.09

[1)]Values are mean±SD (n=3).
[2)]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 5. ABTS radical scavenging activity of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata* (%)

	Concentration (μg/mL)			
	100	200	300	400
70% ethanol extract	29.22±0.14[1)de2)]	30.74±0.10[g]	32.49±1.26[h]	36.07±0.14[i]
Hexane fraction	28.46±0.67[cd]	29.72±0.07[ef]	30.48±0.15[fg]	31.98±0.35[h]
Chloroform fraction	30.32±0.18[fg]	47.20±0.37[m]	56.22±0.63[o]	63.73±0.75[q]
Ethyl acetate fraction	27.69±0.53[c]	48.75±0.40[n]	59.54±0.63[p]	70.36±0.24[r]
Butanol fraction	15.91±0.33[a]	37.08±0.33[j]	40.57±0.37[k]	43.62±0.10[l]
Water fraction	22.03±0.20[b]	32.73±0.79[h]	27.98±0.84[c]	30.72±0.11[g]
Ascorbic acid	2.5	5	10	20
	47.49±0.07	64.73±0.07	93.57±0.07	98.94±0.07
	100	200	300	400
	98.31±0.11	97.91±0.22	98.81±0.12	96.92±0.31

[1)]Values are mean±SD (n=3).
[2)]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 6. DPPH radical scavenging activity of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata* (%)

	Concentration (μg/mL)			
	100	200	300	400
70% ethanol extract	4.85±5.27[1)ab2)]	11.75±6.38[bcd]	18.59±1.77[ef]	23.38±0.16[fg]
Hexane fraction	4.45±3.94[a]	6.11±1.77[ab]	7.93±1.66[ab]	10.23±1.27[abc]
Chloroform fraction	17.40±0.32[def]	26.62±1.32[gh]	30.13±5.87[h]	38.10±2.76[i]
Ethyl acetate fraction	40.65±4.34[i]	64.36±9.77[j]	78.95±2.03[k]	81.56±0.98[k]
Butanol fraction	8.39±5.21[ab]	15.51±1.62[cde]	18.14±3.31[def]	25.49±1.12[gh]
Water fraction	4.31±2.20[a]	5.57±2.45[ab]	5.36±3.03[ab]	9.60±2.85[ab]
Ascorbic acid	5	10	25	50
	12.10±0.69	45.63±4.43	75.71±0.72	94.21±0.22
	100	200	300	400
	96.56±0.23	96.91±0.72	95.93±1.21	96.93±0.91

[1)]Values are mean±SD (n=3).
[2)]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

화제는 이러한 자유 라디칼을 소거하는 능력을 가지고 있다. DPPH는 513 nm에서 흡광도를 보이는 보라색의 화합물로 항산화 활성의 측정에 사용된다(32).

더덕의 추출물 및 그 분획물들의 DPPH 라디칼 소거활성은 Table 6에 나타내었다. 더덕 70% 에탄올 추출물은 시료농도 400 μg/mL일 때 23.38%의 활성을 나타내었으며 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물들은 각각 10.23%, 38.10%, 81.56%, 25.49% 및 9.60%로 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. 더덕 에탄올 추출물과 그 분획물들의 DPPH 라디칼 소거능은 양성 대조물질로 사용한 ascorbic acid보다는 낮았다.

이는 Kwon 등(33)이 산겨릅나무 분획물들 중에 총 페놀 함량이 가장 높았던 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다는 보고와 일치하였다. 또한 Chung(34)도 항산화 성분 함량과 자유 라디칼 소거작용과의 상관관계에서 폴리페놀 함량에 비례하여 활성이 증가한다고 보고하였다. 따라서 더덕 에틸아세테이트 분획물이 다른 분획물들과 비교하여 DPPH 라디칼 소거활성이 월등히 높은 것은 높은 총 페놀 화합물 함량에 기인된 것으로 사료된다.

ORAC assay에 의한 항산화 활성

ORAC assay system을 이용하여 peroxyl radical 및 hydroxyl radical을 측정하였고, 더덕 추출물 및 그 분획물들의 $ORAC_{ROO\cdot}$와 $ORAC_{OH\cdot}$ assay 측정 결과는 Fig. 1, 2에 제시하였다. AAPH를 peroxyl radical generator로 사용하였을

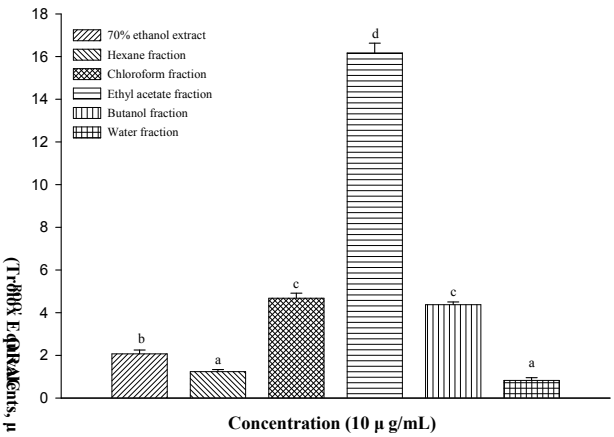

Fig. 1. $ORAC_{ROO\cdot}$ activity (Trolox equivalent, μM) of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata*.
[a–d]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

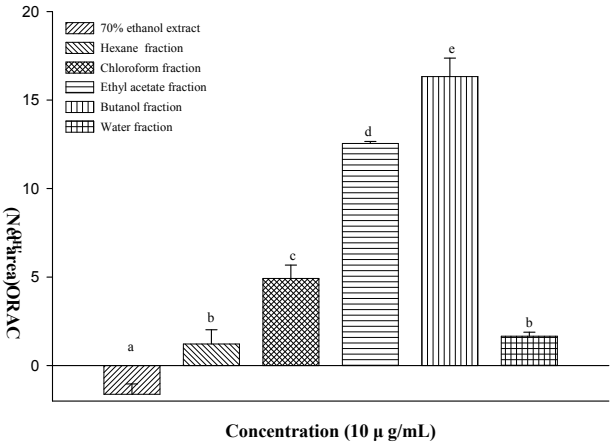

Fig. 2. $ORAC_{OH\bullet}$ activity (Net area) of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopis lanceolata*. [a-e]Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

때 더덕의 추출물 및 그 분획물들은 모두 항산화 활성을 나타내었다. 특히 에틸아세테이트 분획물은 16.2(Trolox Equivalents, μM)로 가장 높은 peroxyl radical 소거 활성을 나타내었다.

한편 H_2O_2-$CuSO_4$를 hydroxyl radical generator로 사용하였을 경우 더덕 부탄올 및 에틸아세테이트 분획물들은 시료 농도 10 μg/mL에서 각각 16.32 및 12.54(Net area)로 높은 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었으나 에탄올 추출물의 hydroxyl radical을 증가시키는 pro-oxidant로 작용을 하였다.

다른 몇몇 연구자들도 특정 polyphenol 화합물들의 pro-oxidant 활성을 보고한 바 있다(35,36). Shin 등(37)은 녹차 물 추출물의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과 농도 의존적으로(1~100 μg/mL) hydroxyl radical 소거활성은 증가하였으나 20~60 μg/mL에서는 pro-oxidant의 활성을 보였다고 보고하였다. 따라서 더덕 70% 에탄올 추출물은 Cu^+와 H_2O_2에 의해 hydroxyl radical의 생성을 촉진시킴으로써 pro-oxidant 활성을 나타내었을 것으로 사료된다. 백삼(6년근)과 백삼(5년근) 에틸아세테이트 분획물을 인산 완충액에 용해하여 AAPH에 의한 peroxyl radical의 생성과 소멸에 따른 fluorescent의 감소율을 ORAC Assay에 의해 측정한 결과 17.8과 15.2였는데(38) 이는 더덕 에틸아세테이트

Table 7. Expression of genes associated with antioxidant system

Genbank ID	Gene symbol	Gene name	Fold[1)]
AK080908	Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble	0.78±0.01[2)]
NM013671	Sod2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	0.99±0.01
NM011435	Sod3	Superoxide dismutase 3, extracellular	1.11±0.02
NM016892	Ccs	Copper chaperone for superoxide dismutase	0.96±0.10
NM145451	Gpx6	Glutathione peroxidase 6	0.77±0.04
NM024198	Gpx7	Glutathione peroxidase 7	0.70±0.09
NM010358	Gstm1	Glutathione S-transferase, mu 1	0.97±0.04
NM008183	Gstm2	Glutathione S-transferase, mu 2	0.98±0.06
NM026764	Gstm4	Glutathione S-transferase, mu 4	1.22±0.06
NM010360	Gstm5	Glutathione S-transferase, mu 5	0.98±0.05
NM008184	Gstm6	Glutathione S-transferase, mu 6	0.89±0.04
BC051924	Gstm7	Glutathione S-transferase, mu 7	1.04±0.06
NM008181	Gsta1	Glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)	1.02±0.14
NM008182	Gsta2	Glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	1.02±0.10
NM010357	Gsta4	Glutathione S-transferase, alpha 4	0.84±0.03
NM008185	Gstt1	Glutathione S-transferase, theta 1	0.98±0.04
NM010361	Gstt2	Glutathione S-transferase, theta 2	0.77±0.03
NM133994	Gstt3	Glutathione S-transferase, theta 3	1.13±0.02
NM029555	Gstk1	Glutathione S-transferase kappa 1	1.17±0.02
NM010362	Gsto1	Glutathione S-transferase omega 1	0.98±0.01
NM026619	Gsto2	Glutathione S-transferase omega 2	0.85±0.09
AK008211	Mgst3	Microsomal glutathione S-transferase 3	0.89±0.12
AK033409	Gstcd	Glutathione S-transferase, C-terminal domain containing	1.01±0.02
NM010344	Gsr	Glutathione reductase 1	1.09±0.06
NM011820	Ggtla1	Gamma-glutamyltransferase-like activity 1	1.13±0.13
NM013602	Mt1	Metallothionein 1	0.49±0.11
NM008630	Mt2	Metallothionein 2	0.66±0.23
NM013603	Mt3	Metallothionein 3	1.02±0.09
NM008631	Mt4	Metallothionein 4	1.11±0.13
NM001029848		Mus musculus metallothionein 1K (LOC574530), mRNA	1.25±0.04
NM010841		Mus musculus metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin) (Mtl5), mRNA	1.06±0.11

[1)]Fold change equal to 1 indicates that gene expression was not altered by *Codonopsis lanceolata* ethyl acetate fraction (CLEA); fold change greater than 1, up-regulation by CLEA; up-regulation by CLEA; fold change less than 1, down-regulation by CLEA.
[2)]Values are mean±SD (n=3).

분획물과 유사한 수준이었다.

항산화 유전자들 발현에 대한 microarray 및 RT-PCR 결과

항산화 효과가 가장 높은 더덕 에틸아세테이트 분획물이 고지방식이 섭취에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대항하여 항산화 유전자 발현에 미치는 영향을 microarray 기법을 이용하여 알아본 결과는 Table 7과 같다. 고지방식이를 급이한 대조군과 더덕 에틸아세테이트 섭취군(HFD+ CLEA) 간의 유전자 변화가 전혀 없을 때는 1배이고 1배보다 높으면 대조군과 비교하여 발현이 증가한 것이며 1보다 낮으면 대조군과 비교하여 발현이 감소되었다는 것을 의미한다. 31종의 항산화 유전자 중 superoxide dismutase 3, extracellular(Sod3), glutathione S-transferase, mu 4(Gstm4), glutathione S-transferase, theta 3(Gstt3), glutathione S-transferase kappa 1(Gstk1), gamma-glutamyltransferase-like activity 1(Ggtla1), metallothionein 4(Mt4), mus musculus metallothionein 1K(LOC574530), mRNA는 각각 1.11, 1.22, 1.13, 1.17, 1.13, 1.11 그리고 1.25배 증가하였다. Superoxide dismutase 1, soluble(Sod1), glutathione peroxidase 6(Gpx6), glutathione peroxidase 7(Gpx7), glutathione S-transferase, theta 2(Gstt2), metallothionein 1 (Mt1), metallothionein 2(Mt2)는 각각 0.78, 0.77, 0.70, 0.77, 0.49 그리고 0.66배로 CLEA 섭취군이 대조군보다 감소하였다. 31종 항산화 유전자 중 고지방식이와 함께 CLEA를 섭취한 군(HFD+CLEA)이 고지방식이만 섭취한 대조군과 비교하여 2배 이상 발현증가를 보이는 것은 없었으나 Mt1은 2배 이상 발현이 감소하였다.

Microarray 결과 중 주요 항산화유전자 발현정도를 RT-PCR로 재확인한 결과는 Fig. 3과 같다. Microarray 결과에서는 고지방식이와 함께 CLEA를 섭취한 군이 고지방식이만 섭취한 대조군과 비교하여 SOD1과 MT1 발현이 현저히 감소하였으나 RT-PCR 결과는 유의적 차이가 없었다. MT2는 microarray 결과는 유의적 차이가 없었으나 RT-PCR 결과는 CLEA 섭취에 의해 유의적으로 감소하였다.

세포내 항산화 방어 시스템은 활성산소종에 의한 연쇄반응의 개시 및 진행을 저해하므로 세포를 방어하여 주는 것으로 알려져 있다. 즉 SOD는 과산소 음이온을 과산화수소로 바꾸어주고, CAT는 과산화수소를 분해함으로써 과산소 음이온의 작용으로부터 세포를 보호하게 된다. 또한 GPx는 GR과 함께 작용하여 과산화수소를 물과 산소로 분해시켜서 과산화수소와 환원형 glutathione으로부터 물과 산화형 glutathione을 만들고, GR은 산화형 glutathione을 다시 환원형 glutathione으로 환원시키는 역할을 한다(39).

Chung 등(40,41)은 산화적 스트레스가 항산화 유전자들의 발현을 증가시킨다고 보고하였다. 본 실험 결과 항산화 유전자 발현이 감소된 것은 더덕 에틸아세테이트의 강한 직접적인 항산화 효과에 의해 고지방식이에 의해 유도된 산화적 스트레스 조건을 개선한 결과인 것으로 추정된다.

Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR validation of microarray data on antioxidant systems related genes expression. The antioxidant systems related mRNA levels in each sample were normalized to the β-actin level. The density of each mRNA band was quantified by using SigmaGel software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Significant differences were compared with control at $^{***}p<0.001$ vs. control, $^{**}p<0.05$ vs. control, $^{*}p<0.01$ vs. control. Abbreviations: CLEA=*Codonopsis lanceolata* ethyl acetate fraction, HFD=high fat diet, SOD 1=Cu/Zn superoxide dismutase, SOD 2=Mn superoxide dismutase, MT=metallothionein, GST=glutathione-S-transferase.

Won과 Oh(10)는 10% 수준의 지방함유 식이에 더덕 육질 및 더덕 껍질을 혼합급이한 결과 혈청지질 수준 감소에 효과적이었으며, 더덕 물 추출물의 혼합급이 시에는 혈청 중 중성지질과 총 콜레스테롤 농도가 감소하였다고 하였다(6). 본 연구팀 역시 40% 고지방식이에 더덕 에틸아세테이트를 섭취시켰을 때 지질 개선 효과를 볼 수 있었는데(결과미제시), 따라서 더덕 에틸아세테이트 분획물은 간접적인 항산화 효과보다는 직접적인 항산화 효과에 의해 비만에 의해 유도된 산화적 스트레스를 방지함으로 산화적 스트레스와 관련된 질병을 개선시켜 주는 기능성 소재일 것이라 생각된다.

요 약

더덕 70% 에탄올 추출물(CL) 및 그 분획물들(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물)의 *in vitro* 항산화 효과는 총 페놀 함량, 환원력, ABTS, DPPH 및 ORAC 분석법들로 실험하였다. 더덕 70% 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물(CLEA)은 가장 높은 총 페놀 함량을 보여주었고 그 함량은 22.7 mg/g이었으며, CLEA는 250~1,000

μg/mL에서 0.42~1.27로 뛰어난 환원력을 가지고 있었다. 100~400 μg/mL에서 CLEA는 27.7~70.3의 ABTS radical 소거작용을 보여주었으며, 400 μg/mL에서 81.6%로 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다. CLEA는 가장 높은 $ORAC_{ROO}$· 활성을 가졌고, CLEA와 부탄올 분획물은 70% 에탄올, 헥산, 클로로포롬 그리고 물 분획물보다 현저하게 높은 $ORAC_{ROO}$· 활성을 나타내었다. CLEA는 CL 70% 에탄올 추출물과 그 분획물들 중 가장 높은 항산화효과를 가지고 있었다. 따라서 고지방식이에 의해 산화적 스트레스가 유발된 동물 모델에 CLEA를 섭취시켰을 때 항산화 유전자 발현 변화를 microarray와 RT-PCR 기법으로 알아보았다. 31개의 항산화 유전자가 발현되었으나 CLEA 섭취에 의해 2배 이상 발현 증가를 보인 항산화 유전자는 없었다. 결론적으로 CLEA는 직접적인 항산화 효과는 있으나 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스 내에서 항산화 유전자 발현 증가에 의한 간접적인 항산화 효과는 없었다.

문 헌

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
2. Lee YE, Hong SH. 2003. *Natural food material*. Kyomunsa Publishers Inc., Seoul, Korea. p 150-151.
3. Choi MS, Choi PS. 1990. Plant regeneration and saponin contents in *Codonopsis lanceolata* L. *Korean J Med Crop Sci* 7: 275-281.
4. Kang YH. 2009. Phenolic compounds and antioxidant activity in cell wall materials from Deodeok (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Sci Technol* 41: 345-349.
5. Han EG, Cho SY. 1997. Effects of *Codonopsis lanceolata* water extract on the activities of antioxidative enzymes in carbon tetrachloride treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 1181-1186.
6. Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. 1998. Effects of *Codonopsis lanceolata* water extract on the level of lipid in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 940-944.
7. Maeng YS, Park HK. 1991. Antioxidant activity of ethanol extract from *Ddodok* (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Sci Technol* 23: 311-316.
8. Ryu HS. 2008. Effects of *Codonopsis lancelata* extract on mouse immune cell activation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 21: 263-268.
9. Lim SD, Seung KS, Kim KS, Han DU. 2007. Effect of fermented milk with hot water extract from *Acanthopanax senticosus* and *Codonopsis lanceolata* on the immune status of mouse. *Korean J Food Sci Technol* 39: 323-329.
10. Won HR, Oh HS. 2007. Antioxidative activity and lipid composition from different part and supplement of *Codonopsis lanceolata* in rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1128-1133.
11. Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. 2008. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 40: 696-701.
12. Ming M, Guanhua L, Zhanhai Y, Guang C, Xuan Z. 2009. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet *in vivo*. *Food Chem* 113: 872-877.
13. Gutfinger T. 1958. Polyphenols in olive oil. *J Am Oil Chem Soc* 58: 966-968.
14. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
15. Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTs radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
16. Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI. 1993. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor J Pharmacol* 24: 299-303.
17. Kwak HK, Blumberg JB, Chen CY, Milbury PE. 2006. Microplate-based oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay of hydrophilic and lipophilic compartments in plasma. *Nutr Sci* 9: 48-54.
18. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Totoda Y, Nakai M, Shibata H, Yao XS. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol Pharm Bull* 27: 1093-1098.
19. Cao G, Sofic E, Prior RL. 1997. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship. *Free Radic Biol Med* 22: 749-760.
20. Oh HT, Kim SH, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS. 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*). *Toxicol in Vitro* 22: 1484-1488.
21. Kim IW, Shin DH, Choi U. 1999. Isolation of antioxidative components from the bark of *Rhus verniciflua* S. screened from some Chinese medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 31: 855-863.
22. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
23. Lee BW, Kang NS, Park KH. 2004. Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 270-273.
24. Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. *Korean J Food Sci Technol* 30: 680-687.
25. Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA. 1998. Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. *Korean J Food Sci Technol* 30: 672-679.
26. Choi HJ. 2009. Antioxidant and hypocholesterolemic effects of *Adenophora triphylla* ethyl acetate extract *in vitro* and *in vivo*. *MS Thesis*. Gangwon National University, Chunchon, Korea. p 27-29.
27. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2008. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and C57 BL/6J mice. *Eur J Pharmacol* 578: 159-170.
28. Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.

29. Choi YM, Yu KW, Han NS, Koh JH, Lee JS. 2006. Antioxidant activities and antioxidant compounds of commercial red wines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1286-1290.
30. Cha WS, Ju IS, Yun DH, Chun SS, Kim JH, Cho YJ. 2009. Biological activity of extracts from cherry sage (*Salvia officinalis* L.). *J Life Sci* 19: 390-396.
31. Kim YC, Hong HD, Rho JH, Cho CW, Rhee YK, Yim JH. 2007. Changes of phenolic acid contents and radical scavenging activities of ginseng according to steaming times. *J Ginseng Res* 31: 230-236.
32. Oh WG, Jang IC, Jeon GI, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidative activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 677-683.
33. Kwon HN, Park JR, Jeon JR. 2008. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1389-1394.
34. Chung HJ. 1999. Antioxidant effect of ethanolic extracts of some tea materials on red pepper seed oil. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1316-1320.
35. Galati G, O'Brien PJ. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37: 287-303.
36. Yang G, Kaio J, Kin K, Yurkow ES, Yang CS. 1998. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogensis* 19: 611-616.
37. Shin JK, Kim GN, Jang HD. 2007. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. *J Med Food* 10: 32-40.
38. Kim SH, Kim YM. 2007. Determination of the antioxidant capacity of Korean ginseng using an ORAC assay. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 393-401.
39. Choi HJ, Kim SH, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. 2008. Effects of *Adenophora triphylla* ethylacetate extract on mRNA levels of antioxidant enzymes in human HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1238-1243.
40. Chung MJ, Walker PA, Brown RW. 2005. ZINC-mediated gene expression offers protection against H_2O_2-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharm* 205: 225-236.
41. Chung MJ, Hogstrand C, Lee SJ. 2006. Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. *Exp Biol Med* 231: 1555-1563.

(2009년 10월 22일 접수; 2009년 1월 4일 채택)