

ISSN 1229-8565 (print) ISSN 2287-5190 (on-line)

한국지역사회생활과학회지 26(1) : 103~113, 2015

Korean J Community Living Sci 26(1) : 103~113, 2015

<http://dx.doi.org/10.7856/kjcls.2015.26.1.103>

## 한국산과 중국산 산사의 항산화 활성 및 암세포 증식 억제효과

박 용 현 · 이 현 주<sup>1)</sup> · 이 재 준<sup>†</sup>  
조선대학교 식품영양학과 · 한경대학교 영양조리과학과<sup>1)</sup>

### Effects of Korean and Chinese *Crataegi Fructrus* on the Antioxidant Activity and Antiproliferation of Cancer Cells

Yonghyun Park · Hyun-Joo Lee<sup>1)</sup> · Jae-Joon Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Dept. of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University, Gyeonggi-do 456-749, Korea<sup>1)</sup>

#### ABSTRACT

This study examines the effects of Korean *Crataegi fructrus*(KCF) and Chinese *Crataegi fructrus*(CCF) on the antioxidative activity and antiproliferation of human cancer cells(HCT-116 human colon, Hep G2 human liver, and A549 human lung cancer cells). The total polyphenol and flavonoid contents, and antioxidative index of the *Crataegi fructrus* ethanol extracts were significantly higher in KCF than in CCF. The DPPH radical-scavenging activity of the KCF ethanol extract was 82.26%(1000 ppm), and that of the CCF ethanol extract was 77.64%. Antiproliferation effects of 80% ethanol extracts of KCF and CCF on human cancer cells(HCT-116, Hep G2 and A549) increased in a dose-dependent manner. Inhibitory effects of KFC on HCT-116 and A549 cells were greater than those of CCF. The results suggest that ethanol extracts of *Crataegi fructrus* have antioxidative and hyperplasia inhibition effects on human cancer cells.

Key words: *Crataegi fructrus*, antioxidative effect, cytotoxic effect, human cancer cell lines

#### I. 서론

현대인의 대표적인 만성질환인 암은 생체 조직 안에서 세포가 무제한으로 증식하여 악성 종양을 일으키는 질병으로, 서구화된 식생활과 환경 변화

등으로 암 발생률과 사망률은 계속 증가하고 있다(Seol et al. 2002). 암은 세계적으로 사망 원인의 약 20%를 차지하고 있고(World Health Organization 2012), 국내에서도 인구 10만 명당 사망률이 가장 높으며(Statistics Korea 2012), 갑상선암, 위암, 대장

This study was supported by the 2014 research fund of Chosun University.

접수일: 2015년 1월 29일 심사일: 2015년 2월 2일 게재확정일: 2015년 2월 13일

<sup>†</sup>Corresponding Author: Lee, Jae-Joon Tel: 82-62-230-7725

e-mail: [leejj80@chosun.ac.kr](mailto:leejj80@chosun.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

암, 폐암, 간암 순으로 암 발생률이 높은 것으로 보고되었다(Central Cancer Registry Center in Korea 2011). 최근 많은 연구에 의하면 활성산소가 인체 기능의 저하를 유도하여 암을 비롯한 성인병 및 노화 기전에 관여하고 있음을 제시하고 있으며, 생활환경과 식생활의 변화 등으로 각종 성인병 및 노화에 관여하는 활성산소에 대한 관심이 증가하고 있다(Valko et al. 2007). 정상적인 활성산소의 발생과 체내 항산화 효소의 활동과 같은 항산화 반응 간의 균형이 깨어져 체내 활성산소가 축적된 상태를 산화적 스트레스(oxidative stress)라 하며 (Burak Climen 2008), 과잉으로 생성된 활성산소는 세포를 구성하는 지질, 단백질, 탄수화물 및 DNA와 반응하여 산화적 손상 및 효소활성을 변화시켜 세포 손상을 가져와 암뿐만 아니라 비만, 당뇨병, 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 관절염, 치매 등과 같은 각종 질환을 일으키는 원인이 된다(Stadtman & Berlett 1998; Yun 2000). 식물유래 생리활성물질인 phytochemical은 free radical 소거 등을 통하여 산화적 스트레스를 감소시키기 때문에 이러한 생리활성물질을 포함하는 과일 및 채소의 섭취는 항암, 항산화, 항염증 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Liu 2003). 이에 식물 중에 함유된 생리활성 작용을 나타내는 물질의 분리·동정하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 더 나아가 고부가가치의 물질로 개발되고 있다.

산사(*Crataegi fructus*)는 특유의 향긋한 냄새와 단맛과 신맛을 가지고 있는 장미과(Rosaceae)에 속한 산사나무(*Crataegus pinnatifida* Bunge)의 성숙한 과실로, 우리나라 및 중국, 일본 전역에 자생하고 있다(Jeong et al. 1999). 예로부터 산사는 음식의 소화를 돕고, 혈의 소통을 원활하게 하며 어혈을 없애는 효능이 있어 한방에서 자주 사용되고 있는 약재이다. 하지만 최근에는 산사에 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 건강식품으로 인식되면서 효소나 약용주 등으로 이용되고 있으며, 이에 따라 산사에 관한 생리활성 연구뿐만 아니라 식품에 활용한 연구(Wang et al, 2000; Shin & Yoon 2011)들도 보고되고 있다. 산사의 약리성분으로 cyanidin-3-galactoside, protocatechuic acid, hyperoside, isoquercitrin, pyrogallol, ursolic acid, corosolic acid,

(-)-epicatechin 등이 알려져 있다(Kim et al. 1993a; Oh & Kim 1993; Park et al. 1994; Liu et al. 2010; Ryu et al. 2010). 산사의 생리활성 연구로는 지질 대사 개선효과(Wang et al. 2009), 고지혈증과 간 기능 개선효과(Ban et al. 2006), 기억력 개선 및 인지능력 향상효과(Kim et al. 1993b), 항산화효과(Wang 1985),  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 저해효과(Kim & Jeong 2007), 혈압 강하효과(Kim et al. 2007), 항균효과(Ryu et al. 2010) 등 다양한 연구들이 보고되고 있다. 현재 국내에서 이용되고 있는 산사는 크기가 작고 색이 붉으며 통으로 말린 한국산 산사와 국내산보다 크기가 크고 붉은색이 적으며 절편의 형태인 중국산 산사로, 한국산과 중국산 산사에 대한 이화학적 성분 비교(Lee & Lee 2012) 및 산사가루를 첨가한 식빵의 품질특성 비교연구(Song et al. 2012)와 같은 산사의 원산지에 따른 비교 연구가 보고된바 있으나, 생리활성 비교 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국산과 중국산 산사의 항산화 효과와 암세포 증식 억제효과를 비교분석하여 산사가 다양한 기능성 식품소재로 활용할 수 있는 자료를 제공하고, 소비자들에게 올바른 기능성 식품을 선택할 수 있는 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

## II. 연구방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 산사는 2012년 4월 서울경동시장에서 구입하여 수세한 후 동결건조기(ED 8512, Ilshin, Yangju, Korea)를 이용하여 -70°C에서 72시간 건조하였다. 동결 건조된 산사는 분쇄기로 20 mesh로 마쇄 후 -70°C에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. 각 실험항목에 대한 시료의 분석은 3회 반복 실시하였다.

### 2. 시료추출

산사 분말 100 g 당 80% ethanol 1500 mL을 첨가한 후 환류냉각관을 부착한 65°C의 heating mantle(Mtops ms-265, Seoul, Korea)에서 3시간씩 3

회 추출한 다음 Whatman filter paper(No.2, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA VACUUM NVC-1100, Tokyo, Japan)로 용매를 제거하고 감압농축한 다음 동결 건조시켜, 시료의 산화를 방지하기 위해 -70°C에 냉동 보관하면서 사용하였다.

### 3. 총 polyphenol 함량

산사 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 Folin-Denis법(Folin & Denis 1912)에 따라 측정하였다. Test tube에 산사 에탄올 추출물을 각각 1 mL과 Folin reagent 2 mL을 넣은 후 실온에서 3분간 정치한 다음 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mL을 첨가하였고, 이를 혼합한 후 30°C에서 40분간 정치하였으며, UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid를 이용하여 최종 농도가 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL가 되도록 조제하였으며, 이 검량곡선으로부터 시료 중의 총 polyphenol 함량을 구했다.

### 4. 총 flavonoid 함량

총 flavonoid 함량은 Davis법을 변형한 방법(Chae et al. 2002)에 따라 측정하였다. 산사 에탄올 추출물 각각 1 mL에 diethylene glycol 2 mL를 첨가한 다음 1N NaOH 20  $\mu$ L을 넣고 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV- spectrophotometer(Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 rutin을 이용하여 최종 농도가 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL가 되도록 조제하였으며, 이 검량곡선으로부터 시료중의 flavonoid 함량을 구했다.

### 5. DPPH radical 소거능

산사 에탄올 추출물의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 산사 에탄올 추출물을 각각 1 mL과 0.2 mM DPPH 1 mL을 test tube에 취한 후 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켜 UV- spectro-

-photometer(Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 활성의 비교를 위하여 양성대조군으로 비타민 C와 합성 항산화제인 BHA와 BHT를 이용하여 동일한 방법으로 측정하였다. 산사 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 (1-시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)  $\times$  100에 의하여 계산하여 나타났다.

### 6. 항산화지수

항산화지수(antioxidant index, AI)는 Joo & Kim (2002)의 방법에 의하여 Rancimat(Metrohm Model 679, Herisan, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 산사 에탄올 추출물에 포함된 용매를 완전히 제거한 함량이 600 ppm이 되도록 soybean oil(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 첨가하고, 초음파(SONICS®, UCX-750, CT, USA)를 이용하여 시료 추출물과 유지가 잘 혼합되도록 하였다. Rancimat의 측정 조건은 산사 에탄올 추출물 각각 3.0 g을 반응 용기에 취하고 증류수 70 mL를 측정 용기에 넣은 후, 110°C에서 air flow rate 20 L/h로 하여 산화안정성을 비교하였다. 합성 항산화제인 BHA와 BHT와 천연 항산화제인 비타민 C는 양성대조군으로 아무 것도 첨가하지 않은 것을 음성대조군으로 비교 실험하였다. 모든 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다.

### 7. 세포배양

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 간암세포인 Hep G2, 인체 대장암세포인 HCT-116, 인체 폐암세포인 A549로 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각 세포주는 100 Units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Rockville, MD, USA)과 10%의 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 RPMI 1640(Rosewell Park Memorial Institute, Hyclone, Logan, UT, USA), DMEM(Dulbecco Minimum Essential Medium, GIBCO, Rockville, MD, USA), MEM(Minimum Essential Medium, GIBCO, Rockville, MD, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Model 311, Forma, Waltham, MA, USA)에서 배양

하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2-3회 refeeding하고, 6-7일 만에 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리해 원심분리 하였다. 그 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mL cell culture flask에서 계대 배양하면서 실험하였다.

### 8. 암세포 증식 억제율

암세포 증식 억제효과를 측정하기 위해 Ishiyama et al.(1996)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay로 실험하였다. 즉,  $1 \times 10^5$  cell/well 농도로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 다음 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정 농도로 희석된 추출물을 100  $\mu$ L를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well 당 10  $\mu$ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100  $\mu$ L를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA Microplate Reader(ELx808, Bio Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포 증식 억제율은 다음의 식에 따라 생존율을 표시하였다.

$$\text{Cell viability (\% of control)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{control 흡광도}} \times 100$$

### 9. 통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 실시하여 얻은 결과로, 본 실험에서 얻어진 결과는 SPSS 18.0 P/C package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계 분석하였다. 실험군당 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였고, 세 집단 이상의 평균치 분석은 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 통계적 유의성 검정은  $p < 0.05$  수준에서 Tukey's test를 이용하여 상호 검정(Post-Hoc test)하였으며, 두 집단 간 통계적 유의성 검정은 Student's *t*-test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 총 polyphenol 함량

Penolic compound는 식물의 대표적인 2차 대사산물로 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물로서 다양한 생리활성에 관여하며, 특히 항산화작용과 관련하여 페놀성 화합물은 연쇄반응에서 alkylperoxy radical이나 alkylradical에 수소를 공여함으로써 그 radical을 제거하여 산화를 억제하는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2004). 산사 phenol compound의 대부분을 차지하는 것은 quercetin이며 hyricetin, gentisic acid, caffeic acid, catechin, salicylic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, narigin, *p*-coumaric acid 등도 포함되어 있다고 보고(Lim et al. 2004)된 바 있다.

본 실험에서는 산사 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 tannic acid를 기준 물질로 측정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 한국산 산사와 중국산 산사 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량은 각각 127.00 mg/g과 103.30 mg/g으로, 한국산 산사가 중국산에 비하여 유의적으로 높은 함량을 보였다. 산사와 같은 장미과에 속하는 비파의 경우 과육의 총 polyphenol 함량은 20.7 mg/g이며, 잎, 씨 및 과육 순으로 총 polyphenol 함량이 높았다고 보고(Kim et al. 2006)되어, 본 연구결과와 비교해보면 비파에 비하여 산사의 총 polyphenol 함량이 높은 것을 알 수 있다. 또한 장미과에 속한 자두의 경우 2품종의 총 페놀성 화합물의 함량은 과육에서 224.2 mg%, 252.6 mg%와 과피에서 604.6 mg%, 892.4 mg%로 품종에 관계없이 과피에서 과육보다 약 3배 높게 나타났다고 보고되었다(Jung et al. 2005). 따라서 산사의 경우 보통 과피와 함께 말려 이용되기 때문에 더 많은 항산화 성분의 함유로 인하여 높은 항산화효과를 기대해 볼 수 있을 것이라 사료된다. 또한 총 polyphenol 함량이 높을수록 다양한 생리활성을 가져 기능성물질로 유용하게 활용할 수 있다는 점에서, 총 polyphenol 함량이 더 높게 나타난 한국산 산사가 중국산 산사보다 유용할 것으로 판단된다.

**Table 1.** Total polyphenol and flavonoid content of 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus*

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
KCF <sup>1)</sup>	127.00±3.26 <sup>3)</sup> *	54.05±0.26 <sup>*</sup>
CCF <sup>2)</sup>	102.30±2.84	42.85±1.06

<sup>1)</sup>80% ethanol extract of Korean *Crataegi fructus* (1000 ppm; 1 mg/mL).

<sup>2)</sup>80% ethanol extract of Chinese *Crataegi fructus* (1000 ppm; 1 mg/mL).

<sup>3)</sup>All values are expressed as the mean±SE of triplicate determinations.

<sup>\*</sup>Significant difference between Korean and Chinese *Crataegi fructus* by Student's t-test at \**p*<0.05.

## 2. 총 flavonoid 함량

Flavonoid는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>를 기본 골격으로 하는 담황색 또는 노란색을 띠는 페놀성 화합물의 총칭으로, 항산화, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하 작용 및 면역증강 작용 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Cha & Cho 2001). 본 연구에서 산사 에탄올 추출물의 총 flavonoid 함량은 rutin을 기준 물질로 측정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 한국산 산사와 중국산 산사 에탄올 추출물의 총 flavonoid 함량은 각각 54.05 mg/g 과 42.85 mg/g으로, 총 polyphenol 함량이 더 높았던 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 유의적으로 높은 함량을 보였다. Lee et al.(2012)의 연구에서도 국내에서 시판되는 11종의 과일 껍질에 함유된 총 polyphenol 및 flavonoid를 측정한 결과, 시료 중의 총 polyphenol 함량과 flavonoid 함량 간의 비교적 높은 정의 상관관계가 관찰되어 과일 껍질의 총 polyphenol 함량이 높은 시료는 flavonoid 함량도 비교적 높게 함유된 것으로 보고하였다. Yoon et al.(2011)이 보고한 자두(후무사)의 flavonoid 함량은 80% ethanol(50°C) 추출물에서 29.65 mg/100 g으로 가장 높았고, 60% acetone(25°C) 추출물이 27.89 mg/100 g, 80% ethanol(25°C) 추출물에서 22.90 mg/100 g 순으로 용매별 및 온도별로 차이를 보였으며, 본 연구결과와 비교해 자두에 비하여

산사의 flavonoid 함량이 더 높은 것으로 나타났다. Hwang et al.(2003)에 의하면 산사와 같은 장미과에 속하는 앵두의 경우 앵두 70% ethanol 추출물의 flavonoid류는 quercitrin 14.9 mg%, tannin 6.0 mg% 및 catechin 5.2 mg%로, quercitrin이 앵두의 주요 flavonoid라 보고된 바 있다. 본 연구에서 산사에는 높은 함량의 총 polyphenol 및 flavonoid를 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 이로 인하여 산사는 천연 항산화제 이외에도 다양한 기능성 식물 소재로 활용 가능할 것으로 생각된다.

## 3. DPPH radical 소거능

한국산과 중국산 산사 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 1000 ppm에서 한국산 산사와 중국산 산사 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 각각 82.26%와 77.64%로 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 유의적으로 높게 나타났고, 합성항산화제인 BHT와 BHA에 비하여 천연항산화제인 비타민 C의 DPPH radical 소거능이 더 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 한국산 산사 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 비타민 C에 비해서는 적었으나, BHT 및 BHA와는 비슷한 수준으로 나타났고, 중국산 산사 에탄올 추출물은 BHT 및 BHA 보다 유의적으로 낮게 나타났다. Park et al.(2006)은 산약, 행인, 산사, 지실의 4종류 한약재를 물과 에탄올로 추출하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 1000 ppm에서 물과 에탄올 추출물 모두 산사에서 각각 72%와 89%로 가장 높았다고 보고하였다. 또한 다른 연구에서도 산사 추출물의 DPPH radical 소거능이 α-tocopherol이나 BHA 보다 유사하거나 강한 항산화 활성을 나타내어 산사의 항산화 활성이 높음이 보고된 바 있다(Park et al. 2010). 장미과에 속하는 다른 과일인 비파 ethyl acetate 분획물의 경우 DPPH radical 소거능은 씨를 제거한 과일, 과피 및 과육에서 각각 74%, 52% 및 30%로 나타났다고 보고하였다(Bae et al. 2002). 살구 과육 추출물의 DPPH radical 소거능은 BHT와 α-tocopherol보다 다소 낮았으며(Yoo et al. 2007), 자두 과육 추출물도 BHA와 α-tocopherol보다 다소 낮았으나, 과피 추출물은 BHA와 α-tocopherol보다 높아 항산화 효과가

**Table 2.** DPPH radical-scavenging activity of 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus*

Samples <sup>1)</sup>	DPPH radical scavenging activity (%)
KCF <sup>2)</sup>	82.26±0.92 <sup>5)6)</sup>
CCF <sup>3)</sup>	77.64±0.62 <sup>c</sup>
BHT <sup>4)</sup>	84.30±0.81 <sup>b</sup>
BHA <sup>4)</sup>	85.87±0.73 <sup>b</sup>
Vitamin C	92.15±0.88 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 1000 ppm (1 mg/mL).

<sup>2)</sup>KCF: 80% ethanol extract of Korean *Crataegi fructus*.

<sup>3)</sup>CCF: 80% ethanol extract of Chinese *Crataegi fructus*.

<sup>4)</sup>BHT: Butylated hydroxytoulene, BHA: Butylated hydroxyanisole.

<sup>5)</sup>All values are expressed as the mean±SE of triplicate determinations.

<sup>6)</sup>Different superscripts indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

우수하였고, 품종에 관계없이 과피가 과육의 2배 이상 높았다고 보고되었다(Jung et al. 2005). DPPH는 짙은 보라색을 나타내는 안정한 free radical로 항산화 물질과 반응하면 radical을 소거시켜 탈색되는 반응을 이용하여 측정하며 항산화 작용의 지표로 사용되고 있다(Lee et al. 2007). DPPH radical 소거능은 항산화능을 지닌 페놀성 물질 함량이 높을수록 소거활성이 증가되며, free radical 물질인 DPPH의 소거활성은 페놀성 물질 함량과 유의적인 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다(Rice-Evans et al. 1997). 이와 관련하여 Park et al.(2008)도 비파 부위별 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능은 총 polyphenol 함량이 높게 나타난 잎, 종자, 과육 순으로 높은 전자공여능을 보였다고 보고하였다. 따라서 본 연구결과 산사 추출물의 DPPH radical 소거능 효과가 우수하게 나타난 것은 산사에 다량 함유된 총 polyphenol과 flavonoid 때문인 것으로 생각되며, 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 DPPH radical 소거 활성이 높게 나타난 것은 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 총 polyphenol과 flavonoid 함량 모두 높았기 때문이라 사료된다.

#### 4. 항산화지수

Rancimat에 의한 항산화지수는 공기에 의한 지질 산패도를 반영하는 것으로 시료를 첨가 후 유지의 복잡한 산화과정 중 유도기간 마지막에 상당량의 저분자량 휘발성 카보닐산이 유리되는 양으로 측정한다(Cha & Choi 1990). 한국산과 중국산 산사 에탄올 추출물의 유지 산화 억제효과를 알아보기 위하여 Rancimat으로 측정한 항산화지수는 Table 3과 같다. 양성대조군으로 사용한 천연항산화제인 비타민 C의 항산화지수가 가장 높았고, 합성항산화제인 BHT와 BHA는 비타민 C에 비하여 낮게 나타났다. 한국산과 중국산 산사의 항산화지수는 BHT, BHA 및 비타민 C에 비해서는 낮았으나 시료를 미첨가한 음성대조군보다는 유의적으로 높게 나타나 한국산과 중국산 산사의 soybean oil에 대한 산화 억제효과가 있는 것으로 확인되었다. 산지에 따른 차이를 살펴보면, 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 항산화지수가 다소 높았으나, DPPH radical 소거능의 결과와는 다르게 산지에 따른 유의적 차이가 없었다. Lee(2002)는 매실 에탄올 추출물도 Rancimat으로 측정한 항산화지수가 대조구보다 높게 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서 한국산과 중국산 산사의 항산화지수는 비슷한 수준으로 나타났으며, 산사에 다량 함유된 총 polyphenol, flavonoid 등의 항산화 활성을 갖는 성분들에 의하여 유도기간을 연장함으로써 유지의 산패 억제효과를 나타낸 것이라 사료된다.

#### 5. 간암세포 증식 억제효과

한국산과 중국산 산사 80% 에탄올 추출물의 간암세포 증식 억제효과를 알아보기 위해 간암(Hep G2) 세포주를 대상으로 MTT assay를 이용한 간암세포 증식 억제효과를 알아보았다. 간암 세포주에 한국산과 중국산 산사 추출물의 농도별(16.125, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL)로 시료 처리를 한 후 각 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 한국산과 중국산 산사 모두 62.50  $\mu$ g/mL 이하에서는 대조군에 비하여 유의적인 생존율의 변화는 없었고, 125  $\mu$ g/mL 이상에서는 추출물의 농도가 증가됨에 따라 간암세포의 생존율

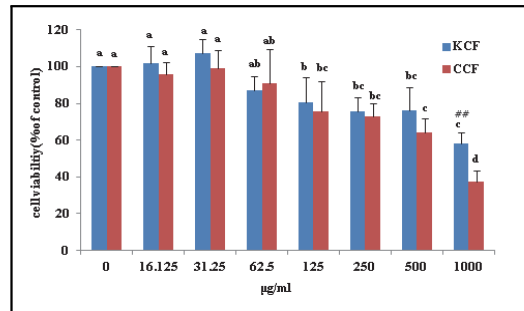
**Table 3.** Antioxidative index of 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus* on soybean oil

Samples <sup>1)</sup>	IP <sup>6)</sup>	AI <sup>7)</sup>
Control <sup>2)</sup>	6.90±0.14 <sup>8)49)</sup>	1.00
KCF <sup>3)</sup>	9.12±0.25 <sup>c</sup>	1.32
CCF <sup>4)</sup>	8.56±0.12 <sup>c</sup>	1.24
BHT <sup>5)</sup>	13.45±0.19 <sup>b</sup>	1.95
BHA <sup>5)</sup>	13.22±0.17 <sup>b</sup>	1.92
Vitamin C	15.43±0.92 <sup>a</sup>	2.24

- <sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 1000 ppm (1 mg/mL).
- <sup>2)</sup>Control : Soybean oil without the *Crataegi Fructus* ethanol extract.
- <sup>3)</sup>KCF: 80% ethanol extract of Korean *Crataegi fructus*.
- <sup>4)</sup>CCF: 80% ethanol extract of Chinese *Crataegi fructus*.
- <sup>5)</sup>BHT: Butylated hydroxytoulene; BHA: Butylated hydroxyanisole.
- <sup>6)</sup>Induction period(IP, hr. min) of oil was determined by the Rancimat test at 110°C.
- <sup>7)</sup>Antioxidant index(AI) is expressed as the IP of oil containing the sample/IP of soybean oil.
- <sup>8)</sup>All values are expressed as the mean±SE of triplicate determinations.
- <sup>9)</sup>Different superscripts indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

이 감소하는 경향이었으며, 가장 높은 농도인 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 58.40%와 37.38%의 생존율로 높은 세포 증식 억제율을 보였다. 산지에 따른 간암세포 증식 억제효과를 비교해 보면, 대개 중국산 산사 추출물이 한국산 산사 추출물에 비해 유의적 차이는 없었으나 증식 억제효과가 더 큰 것으로 나타났으며, 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서만 유의적인 차이를 보였다. 같은 장미과에 속하는 자두의 생육시기에 따른 간암세포(Hep G2)의 증식 억제능을 연구한 결과 1, 2 mg/mL 농도 처리 시 미숙과는 54~94%, 중간숙과는 18~74% 및 완숙과는 28~64%로 중간숙과와 완숙과에 비해 미숙과가 간암세포에 대해서 높은 증식 억제효과가 있으며 (Kim et al. 2004), 이는 자두의 생육이 진행됨에 따라 암세포 억제 효과를 가지는 페놀 화합물인 총 페놀 함량과 총산 함량이 점차 감소되기 때문으로

보고되어 있다(Nakatani et al. 2000). Yoo et al.(2007)은 살구과육 에탄올 추출물을 간암세포인 Hep3B에 대한 억제효과를 검토한 결과 1, 2, 3, 4 mg/mL 농도 처리 시 11.4, 14.6, 46.1, 91.2%를 나타내었으며, 살구씨 추출물에 비해 높은 간암세포 억제효과를 보였다고 하였다. 본 연구에서와 같은 농도인 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 간암세포 억제효과를 비교해 보면 한국산 및 중국산 산사 추출물의 간암세포 증식 억제율은 각각 41.6%와 62.6%로, 살구과육 에탄올 추출물 11.4%에 비하여 산사 추출물의 항암활성이 높은 것으로 판단된다.



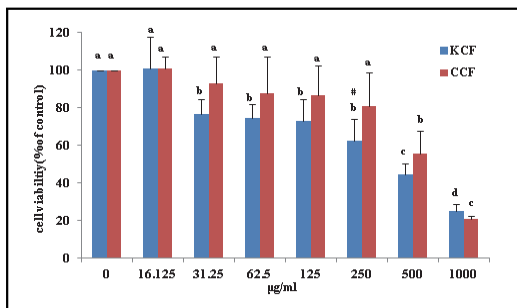
Values are means±SE. <sup>a-c</sup>Values with different superscripts indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey's test. <sup>##</sup>Significant differences in comparison to Chinese *Crataegi fructus* at  $p < 0.01$  by Student's t-test.

**Fig. 1.** Cell viability of the Hep G2 cell line in 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus*.

### 6. 대장암세포 증식 억제효과

한국산과 중국산 산사 80% 에탄올 추출물의 대장암세포 증식 억제효과를 알아보기 위해 대장암(HCT-116) 세포주를 대상으로 MTT assay를 이용한 대장암세포 증식 억제효과는 Fig. 2와 같다. 대장암(HCT-116) 세포주에 한국산과 중국산 산사 추출물의 농도별(16.125, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ )로 시료 처리를 한 후 각 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 한국산 산사 추출물은 농도 31.25  $\mu\text{g/mL}$  이상에서, 중국산 산사 추출물은 500  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 대장암세포의 생존율이 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며 가장 높은 농도인 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 생존율이

각각 24.96%와 20.82%로 대장암세포 증식 억제 효과가 나타났다. 대부분 한국산 산사 추출물이 중국산 산사 추출물에 비하여 더 낮은 세포 생존율을 보여 한국산 산사의 대장암 세포 증식 억제 효과가 더 큰 것으로 나타났으며, 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에 서만 유의적인 차이를 보였다. Shim et al.(2001)이 용매 분획별 석류 추출물의 대장암 세포(HT-29) 증식 억제 연구 결과 모든 용매 분획물에서 60% 이하의 낮은 세포 증식 억제효과를 나타내어 다른 암세포주 간암, 자궁경부암 및 신경교종 세포에 비해 암세포 증식 억제 효과가 미약하였다고 보고 하였다. Ryu & Chung(2011)의 연구에서는 오미자 열수 추출물이 인체 대장암 세포(HT-29) 증식에 미치는 영향을 0, 1, 2 및 4 mg/mL 농도별로 24시간 처리하였을 때 세포사멸 농도는 각각 0, 10, 70 및 88%로 시료 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 효과가 큰 것으로 보고하였다. 본 연구에서와 같은 농도인 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 대장암 세포 억제효과를 비교해 보면 한국산 및 중국산 산사 추출물의 대장암세포 증식 억제율은 각각 75.1%와 79.2%로, 오미자 추출물 10%에 비하여 산사 추출물의 항암 활성이 높은 것으로 판단된다.



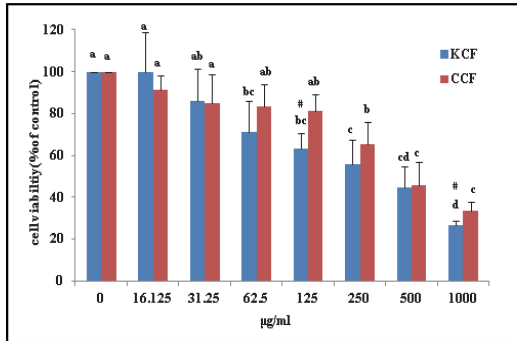
Values are means $\pm$ SE. <sup>a-f</sup>Values with different superscripts indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey's test. <sup>#</sup>Significant differences in comparison to Chinese *Crataegi fructus* at  $p < 0.05$  by Student's t-test.

Fig. 2. Cell viability of the HCT-116 cell line in 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus*.

### 7. 폐암세포 증식 억제효과

한국산과 중국산 산사 80% 에탄올 추출물의 폐암세포 증식 억제효과를 알아보기 위해 폐암(A549) 세포주를 대상으로 MTT assay를 이용한 폐암세포 증식 억제효과는 Fig. 3과 같다. 폐암 세포주에 한국산 및 중국산 산사 에탄올 추출물의 농도별(16.125, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ )로 시료 처리를 한 후 각 세포 생존율을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 한국산 산사 추출물은 62.50  $\mu\text{g/mL}$  이상에서, 중국산 산사 추출물은 250  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 폐암세포의 생존율이 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며 가장 높은 농도인 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 생존율이 각각 26.41%와 33.57%로 폐암세포 증식 억제효과가 나타났다. 산지에 따른 폐암세포 증식 억제효과를 비교해 보면, 31.25  $\mu\text{g/mL}$  농도 이상에서는 중국산 산사 추출물에 비하여 한국산 산사 추출물에서 더 낮은 세포 생존율을 보였으며 125  $\mu\text{g/mL}$ 과 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서만 유의적인 차이를 보였다. 살구 부위별 에탄올 추출물을 폐암세포인 A549에 대한 억제효과를 검토한 결과 4 mg/mL 첨가 시 살구씨 추출물은 63.7%, 살구과육 추출물은 88.2%로 나타나 과육이 씨에 비해 높은 억제효과를 보여 간암 세포와 유사한 경향이였다(Yoo et al. 2007). Park et al.(2006)은 산약, 행인, 산사, 지실의 4종류 한약재를 물과 에탄올로 추출하여 폐암 세포에 대한 증식 억제능을 1000 ppm에서 측정한 결과 물 추출물은 7%, 에탄올 추출물은 4%로 지실과 산약 다음으로 높게 나타났다고 보고하였다. 같은 장미과인 복분자 열매 추출물이 폐암 세포주인 A549에 대하여 생육 억제 활성을 연구한 결과, 농도 0.5 mg/mL 이상에서 80% 이상의 생육 억제 활성을 나타내어(Lee et al. 2003), 본 연구에서 산사 추출물 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 한국산 55.22%, 중국산 54.28%를 나타내어 복분자 추출물보다는 낮은 항암활성을 갖는 것으로 판단 된다.





Values are means±SE. <sup>a-f</sup>Values with different superscripts indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey's test. <sup>#</sup>Significant differences in comparison to Chinese *Crataegi fructus* at  $p < 0.05$  by Student's t-test.

Fig. 3. Cell viability of the A549 cell line in 80% ethanol extracts of Korean and Chinese *Crataegi fructus*.

이상의 결과 산지에 따른 항암활성은 대장암 및 폐암세포에서는 한국산 산사 에탄올 추출물이, 간암세포에 대한 항암활성은 중국산 산사 에탄올 추출물이 더 높은 경향이였다. 또한 가장 높은 농도인 1000 µg/mL에서 70% 이상의 대장암 및 폐암세포의 증식 억제활성을 보였고, 간암세포에서는 40% 이상의 증식 억제활성을 보였다. 이러한 산사 추출물의 암세포 증식 억제효과는 산사 중의 polyphenol류는 항 돌연변이원성이 있으며, polyphenol 물질의 OH기가 발암성을 갖는 불안정한 group과 결합하여 유리기를 소멸시켜 발암성 물질을 불활성화시키는 작용으로 나타난 결과로 판단되며, 향후 더 자세한 연구가 필요하리라 생각된다.

#### IV. 요약 및 결론

본 연구는 산지에 따른 산사의 항산화 및 암세포 증식 억제효과를 비교 분석하였다. 80% 에탄올로 추출한 한국산과 중국산 산사 추출물의 총 polyphenol와 총 flavonoid 함량은 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 유의적으로 높은 나타났다. 1000 ppm에서 한국산과 중국산 산사 추출물의 DPPH radical 소거능은 각각 82.26%와 77.64%로 한국산 산사가 중국산 산사에 비하여 유의적으로

높은 DPPH radical 소거능을 보였으며, Rancimat으로 측정된 한국산과 중국산 산사의 항산화지수는 각각 1.32와 1.24로 BHT, BHA 및 비타민 C에 비해서는 낮았으나, 시료를 미첨가한 음성대조군보다는 높은 항산화력을 보였다. 간암(Hep G2), 대장암(HCT116) 및 폐암(A549)세포에 대한 산사 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제효과를 알아본 결과, 한국산 및 중국산 산사 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 모두 암세포의 증식 억제 활성이 농도 의존적으로 증가하는 경향이였다. 산지에 따른 항암활성은 대장암 및 폐암세포에서는 한국산 산사 에탄올 추출물이, 간암세포에 대한 항암활성은 중국산 산사 에탄올 추출물이 더 높은 경향이였다. 또한 산사 에탄올 추출물 농도 1000 µg/mL에서 70% 이상의 대장암 및 폐암세포의 증식 억제활성을 보였고, 간암세포에서는 40% 이상의 증식 억제활성을 보였다.

#### References

Bae YI, Chung YC, Shim KH(2002) Antimicrobial and antioxidant activities of various solvent extract from different parts of loquat(*Eriobotrya japonica*, Lindl.). Korean J Food Preserv 9(1), 97-101

Ban SS, Yon HD, Shin OC, Shin YJ, Park CS(2006) The effects of *Artemisiac capillaris*, *Ponciri fructus* and *Cartaegi fructus* in obese rats induced by high fat diet. Kor J Herbology 21(3), 55-67

Blois MS(1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181(9) 1199-1203

Burak Climen MY(2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin Chim Acta 390(1-2), 1-11

Central Cancer Registry Center in Korea(2011) Annual report of the Korea central cancer registry. Ministry of Health and Welfare, Korea

Cha GS, Choi CU(1990) Determination of oxidation stability of perilla oil by the Rancimat method. Korean J Food Sci Technol 22(1), 61-65

Cha JY, Cho YS(2001) Biofunctional activities of citrus flavonoids. J Kor Soc Agric Chem Biothchnol 44(2) 122-128

Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH(2002) Standard food analysis. Jigu-Moonwha Sa. pp381-382

Folin O, Denis W(1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. J

- Biol Chem 12(2), 239-249
- Hwang HS, Kim JM, Jeon YJ, Song YA, Park HS(2003) Flavonoids and antimicrobial activity of the ethanol extract of Korean cherry(*Prunus tomentosa* Thunberg). J Korean Soc Food Sci Nutr 32(6), 833-839
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K(1996) A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Bio Pharm Bull 19(11), 1518-1520
- Jeong TS, Hwang EI, Lee HB, Lee ES, Kim YK, Min BS, Bae KH, Bok SH, Kim SU(1999) Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. Planta Med 65(3), 261-263
- Joo KJ, Kim JJ(2002) Oxidative stability and flavor compounds of sesame oils blended with vegetable oils. Korean J Food Sci Technol 34(6), 499-502
- Jung GT, Ju IO, Chio DG, Jeong JS, Ryu J, Ko BR, Choi JS, Choi YG(2005) Chemical characteristics and physiological activities of plums (Oishiwase and Formosa). Korean J Food Sci Technol 37(5), 816-821
- Kim HJ, Jo CH, Kim TH, Kim DS, Park MY, Byun MW(2006) Biological evaluation of the methanolic extract of *Eriobotrya japonica* and its irradiation effect. Korean J Food Sci Technol 38(5), 684-690
- Kim HJ, Yu MH, Lee SO, Park JH, Par DC, Lee IS(2004) Effects of plum fruits extracts at different growth stages on quinone reductase induction and growth inhibition on cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 33(9), 1445-1450
- Kim JH, Kim MU, Cho YJ(2007) Isolation and identification of inhibitory compound from *Crataegi fructus* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. J Korean Soc App Biol Chem 50(3), 204-209
- Kim JP, Chon IJ, Cho HK, Ham IH, Whang WK(2004) The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. Kor J Pharmacogn 35(1), 98-103
- Kim JS, Jeong SH(2007) Quality characteristics of bread added with *Crataegus pinnatifida* bunge powder. J East Asian Soc Dietary Life 17(1), 125-129
- Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS(1993a) Identification of phenolic antioxidative components in *Crataegus pinnatifida* Bunge. J Korean Agric Chem Soc 36(3), 154-157
- Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS(1993b) Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Rets. J Korean Agric Chem Soc 36(3), 203-207
- Lee JH(2002) The effects of *Prunus mume* ethanol extract on the ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. Master's thesis, Chosun university, Gwangju, Korea
- Lee JJ, Lee HJ(2012) Comparisons of physicochemical composition of Korean and Chinese *Crataegi fructus*. Korean J Food Preserv 19(4) 569-576
- Lee JM, Chang PS, Lee JH(2007) Comparison of oxidative stability for the thermally-oxidized vegetable oils using a DPPH method. Korean J Food Sci Technol 39(2), 133-137
- Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY(2003) Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. Korean J Medicinal Crop Sci 11(1), 5-12
- Lee MY, Yoo MS, Whang YJ, Jin YJ, Hong MH, Pyo YH(2012) Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels. Korean J Food Sci Technol 44(5), 540-544
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM(2004) Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci 12(3), 191-202
- Liu RH(2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am J Clin Nutr 78(3), 517S-520S
- Liu T, Cao Y, Zhao M(2010) Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn(*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits. Food Chem 119(4), 1656-1662
- Nakatani N, kayano S, kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T(2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune(*Prunus domestica* L.). J Agr Food Chem 48(11), 5512- 5516
- Oh IS, Kim IH(1993) Pharmaco-constituents of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* leaves(I). Korean J Pharmacogn 37(5), 476-482
- Park CS, Yang KM, Kim ML(2006) Functional properties of medicinal plant extracts. Korean J Food Cookery Sci 23(5), 720-727
- Park SW, Yook CS, Lee HK(1994) Chemical components from the fruits of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa*. Korean J Pharmacogn 25(4), 328-335
- Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Jung IC, Sohn HY(2010) Antimicrobial activity of fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge against multidrug resistant pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp. Korean J Microbiol Biotechnol 38(1), 77-83
- Park SJ, Shin EH, Lee JH(2012) Biological activities of solvent fractions from methanolic extract of *Crataegi fructus*. Korean J Food Nutr 25(4), 897-902
- Park YS, Park YJ, Kim HJ, Im MH, Lee MK, Kim YM, Cho JY, Heo BG(2008) Physiological activity of ethanol extract from the different plant parts of loquat(*Eriobotrya japonica*, Lindl.). Kor J Hort Sci Technol 26(1), 75-80

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G(1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2(2), 152-159
- Ryu MJ, Chung HS(2011) Effects on hot water extract of *Schizandra chinensis* on colon cancer cell line. *Food Engineering Progress* 15(1), 64-69
- Seol KL, Choi SY, Lee JI(2002) A study on the use, understanding satisfaction with alternative therapy for hospitalized cancer patients. *J Korean Public Health Assoc* 28(2), 198-211
- Shim SM, Choi SW, Bae SJ(2001) Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr* 30(1), 80-85
- Shin SJ, Yoon HH(2011) Quality characteristics of *sansapyun* with various amounts of *Crataegi fructus* concentrate. *Korean J Culinary Res* 17(3), 181-190
- Song TH, Choi HS, Kim YS, Woo IA(2012) Study on sensory and mechanical characteristics of white bread containing different levels of Korean and Chinese Sansa(*Crataegus pinatifida* Bunge) powder. *Korean J Food Culture* 27(4), 391-399
- Stadtman ER, Berlett BS(1998) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30(2) 325-243
- Statistics Korea(2012) 2011 cause of death statistics. Statistics Korea. Daejeon, Korea, pp9-10
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J(2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell* 39(1), 44-84
- Wang JM(1985) Chinese herbal pharmacology. Shanghai. Shanghai Science & Technology Publisher. pp67-75
- Wang RJ, Li DF, Bourne S(2000) Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problems in the year 2000 biotechnology in the feed industry. *Proceed. Alltech's 14th Annual Symposium*, pp 273-291
- Wang SB, Ahn EM, Jung JW(2009) The fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine. *Kor J Herbology* 24(4), 165-171
- World Health Organization(2012) World health statistics 2012, World Health Organization. Geneva, Switzerland, pp80-81
- Yoo SJ, Kim SH, Jun MS, Oh HT, Choi HJ, Ham SS(2007) Antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of *Prunus armeniaca* extracts. *Korean J Food Preserv* 14(2), 220-225
- Yoon OH, Jeong BY, Kim EK, Jeong YH(2011) Chemical composition and antioxidant activities of *Prunus salicina* Formosa produced in Gimcheon. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(3), 379-384
- Yun JH(2000) Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract in the activity and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Master's thesis, Duksung Women's University, Seoul, Korea