

## 증숙 더덕 용매별 추출물의 Nitric Oxide 생성 저해 효과 및 Acetylcholinesterase 저해활성

최 현 숙 · \*최 두 복\*

충청대학교 식품영양외식학부 부교수, \*조선대학교 신산업융합학부 부교수

### Nitric Oxide Production and Acetylcholinesterase Inhibitory of Activity Various Extracts from *Codonopsis lanceolata* by Steaming Times

Hyun-Suk Choi and \*DuBok Choi\*

Associate Professor, Dept. of Hotel Culinary Arts Patisserie & Nutrition, Chungcheong University, Cheongju 28171, Korea

\*Associate Professor, Dept. of Advanced Industry Convergence, Chosun University, Kwangju 61452, Korea

#### Abstract

Steaming is a method that has traditionally been used for medicinal plant extraction. This study investigated nitrite oxide production, ferrous ion chelating activity,  $\alpha$ -glucosidase, xanthine oxidase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of ethanol, acetone and hot-water extracts of *Codonopsis lanceolata* prepared by steaming seven times. MTT assay showed that each extract was non-toxic up to a concentration of 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  confirming that there was no cytotoxicity in all extracts. The  $\alpha$ -glucosidase, xanthine oxidase, and acetylcholinesterase inhibitory activities exhibited by the hot-water extract obtained from steaming seven times were higher (83.1%) than the other extracts. Higher production of nitrite oxide and better ferrous chelating activity was recorded with hot-water extract compared to ethanol and acetone extracts. These results indicated that more steaming of *Codonopsis lanceolata* extracts would be required to validate the possibility of developing antioxidants. Also, further study is needed to determine if the components present in the tested extracts might be useful in the prevention of Alzheimer's disease. These results showed that hot-water extracts may be useful for their antioxidant and the production inhibitory activity of nitrite oxide. It will be helpful in the investigation of the constituent analysis of the steam-processed product of *Codonopsis lanceolata*.

Key words: *Codonopsis lanceolata*, steaming process, nitrite oxide, acetylcholinesterase

#### 서 론

Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl(OH), superoxide anion radical( $\text{O}^{\cdot-}$ ) 및 singlet oxygen( $^1\text{O}_2$ ) 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 질병의 원인이 되며(Citron M 2002; Portelius 등 2006), 이들의 생성억제를 위한 약용식물에 대한 관심은 꾸준히 연구되고 있다. 또한 신체내 nitric oxide(NO)는 신호전달에 위해 필요한 매개체이지만, NO가 과다하게 생산될 때는 질병의 원인이 되기도 한다(Choi 등 2017), 그 중 peroxynitrite의 과다생산, 활성산소종의 생성과 지속적인

스트레스는 뇌의 해마 부위에 손상을 주어 기억장애 증상을 수반하는 알츠하이머 질환의 또 다른 원인이 될 수 있다(Citron M 2002; Portelius 등 2006; Han 등 2010). 최근에는 다양한 염증질환을 천연물로 기반하여 염증매개물질의 생성이나 활성을 억제 할 수 있는 항염증 효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Sakanaka 등 2005). 식물의 증숙 과정은 세포의 구성성분들의 변화 유도로서 유용성분 용출을 극대화하는 가공법으로(Song 등 2012) 제품의 기호성을 향상시키고(Kang 등 2015) 항산화 성분이 증가한다는 연구보고가 있다(Hong 등 2007). 더덕도 증숙 과정으로 인해 유도된 물질로

\* Corresponding author: DuBok Choi, Associate Professor, Dept. of Advanced Industry Convergence, Chosun University, Kwangju 61452, Korea. Tel: +82-62-230-7956, Fax: +82-62-608-5253, E-mail: choideb@chosun.ac.kr

다양한 생리활성에 관한 연구가 보고되어 있다(Maeng & Park 1991; Han 등 1998; Lee JH 2002; Shim 등 2004; Byeon 등 2009; Ichikawa 등 2009). 따라서 본 연구는 이전 Lee 등(2021)의 연구결과를 바탕으로 증숙의 횡수를 달리한 시료 중 폴리페놀 함량이 가장 높았던 7회 증숙 과정을 거친 더덕의 에탄올, 아세톤 및 열수 추출물을 사용하여 LPS 자극에 의해 유도되어지는 NO 생성 억제효과, xanthine oxidase,  $\alpha$ -glucosidase 효과 및 철 이온( $Fe^{2+}$ )에 대한 chelating 효과를 측정하였다. 또한 알츠하이머 질병의 가장 확실한 치료 방법인 아세틸콜린 분해 억제를 위해 아세틸콜린에스테라아제(AChE) 저해 활성을 검색하여 뇌신경세포를 보호할 수 있는 예방 물질로의 효과를 검색해 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 더덕의 증숙 및 추출물의 제조

본 실험의 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 전북지역에서 2019년 6월에 상품가치가 떨어지는 하위품질을 구매하여 1 kg으로 정량하여 90°C에서 2시간 동안 증숙한 후 36시간 60°C에서 건조하는 과정을 각각 7회의 과정으로 거쳤다. 7회 증숙한 더덕을 100 g씩 나누어 500 mL의 에탄올, 500 mL의 아세톤 및 500 mL의 뜨거운 물을 사용하여 각각 5 시간동안 실온에서 환류 추출 후 여액을 감압 농축하여 시료로 사용하였다(Table 1).

### 2. MTT assay

7회 증숙 더덕의 용매별 추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 RAW264.7 세포를 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여 100  $\mu$ L의 DMEM 배지와 함께 증숙 더덕 용매별 추출물을 500, 600, 700  $\mu$ g/mL로 처리하여 24시간 배양하였다(Mosmann T 1983). 5  $\mu$ g/mL의 MTT 용액을 각 well에 50  $\mu$ L씩 가하여 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO용액을 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 뒤 발색 정도를 550 nm에서 흡광도를 측정하며, 세포를 포함하지 않은 추출물의 흡광도를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포생존율을 계산하였다.

Cell viability(%)=

$$[(\text{시료구 흡광도} - \text{대조구 흡광도}) / \text{증류수 흡광도}] \times 100$$

### 3. Nitrite oxide 생성 억제 활성 측정

Raw 264.7 세포를 96well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하고 24시간(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 동안 배양한 후, 700  $\mu$ g/mL 추출물시료와 lipopolysaccharide(LPS)를 혼합하여 최종 농도 2  $\mu$ g/mL로 48시간(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 동안 배양하였다. 세포 배양액을 각 well에서 50  $\mu$ L씩 회수하여 새로운 96well plate에 옮기고 50  $\mu$ L의 Gries 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine:1% sulfanilamide=1:1)을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켜 540 nm에서 시료 무첨가구의 흡광도(PBS)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. NO 생성량의 정량은 표준물질 sodium nitrite를 농도별로 조제하여 동일한 방법으로 측정하였다(Ding 등 1988).

아질산염 소거능 (%)=

$$100 - \{(\text{시료구 흡광도} / \text{시료 무첨가구 흡광도}) \times 100\}$$

### 4. 철 이온( $Fe^{2+}$ )에 대한 chelating 효과 측정

Yen 등(2002)의 방법에 따라 시료추출액 1 mL, 80% ethanol 0.8 mL, 2 mM  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ [iron(II) chloride tetrahydrate] 용액 0.1 mL, 5 mM ferrozine[3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4"-disulfonic acid] 용액 0.1 mL를 첨가한 다음 혼합하여 실온에서 10분간 반응 시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 대표적 chelating agent인 ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)를 사용하였다.

Ferrous ion chelating effect(%)=

$$100 - [(\text{시료구 흡광도} / \text{대조구 흡광도}) \times 100]$$

### 5. $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

시료 50  $\mu$ L, 1 unit/mL  $\alpha$ -glucosidase 0.05 mL와 200 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 50  $\mu$ L를 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 처리하였다. 다음에 3 mM pNPG( $p$ -nitrophenyl  $\alpha$ -glucopyranoside) 100  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.1 M  $Na_2CO_3$  0.75 mL로 반응을 정지시켜 405 nm에서

Table 1. Sample code name of the *Codonopsis lanceolata* extracts

Sample code	Descriptions
EDS7	Ethanol extracts of <i>Codonopsis lanceolata</i> by steaming seven times
ADS7	Acetone extracts of <i>Codonopsis lanceolata</i> by steaming seven times
HDS7	Hot-Water extracts of <i>Codonopsis lanceolata</i> by steaming seven times

흡광도를 측정하였다(Kim 등 2008).

$$\alpha\text{-Glucosidase inhibitory activity(\%)} = [1 - (\text{시료구 흡광도} / \text{대조구 흡광도})] \times 100$$

## 6. Xanthine oxidase 저해활성 측정

추출물 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 2 mM xanthine 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase(0.2 unit/mL) 0.1 mL를 가하였다. 다음 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종결시킨 후, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식에 의하여 산출하였다(Stirpe 등 1969).

$$\text{Xanthine oxidase inhibitory activity(\%)} = 100 - [(\text{시료구 흡광도} / \text{대조구 흡광도}) \times 100]$$

## 7. Acetylcholinesterase 저해 활성 측정

7회 증숙한 더덕의 용매별 추출물의 acetylcholinesterase (AChE)저해 활성은 Ellman법(1995)을 변형하여 측정하였다. AChE solution 50  $\mu$ L, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 8.0) 50  $\mu$ L와 각 용매별 추출물(700  $\mu$ g/mL) 25  $\mu$ L를 37°C, 30분간 반응시킨 후 3 mM 5,5'- dithio-bis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 용액 100  $\mu$ L와 0.075 M acetylcholine iodide 25  $\mu$ L를 첨가하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 저해도는 아래의 식을 이용하여 측정한다.

$$\text{Acetylcholinesterase inhibitory activity(\%)} = [1 - (\text{시료구 흡광도} / \text{대조구 흡광도})] \times 100$$

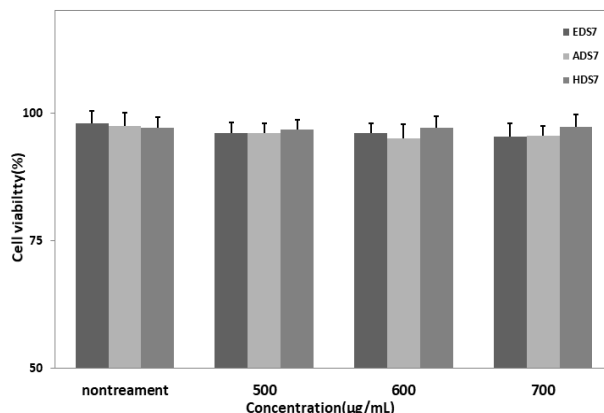
## 8. 통계 처리

본 실험에서는 각 실험 항목을 3회 반복 분석하였다. 통계 처리는 SPSS(version 12.0, Chicago, IL, USA)를 이용하여 다른 부위간의 유의성 검정은  $p < 0.05$  유의수준에서  $t$  검정하였고, 가열 처리간의 유의성 검정은 일원배치분산분석(ANOVA)과 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 실시하여  $p < 0.05$  유의수준에서 다중비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 증숙더덕 용매별 추출물의 세포독성

7회 증숙한 더덕의 에탄올(EDS7), 아세톤(ADS7) 및 열수 추출물(HDS7)의 300, 500, 700  $\mu$ g/mL 농도별 세포 독성을 MTT법으로 실험한 결과는 Fig. 1과 같다. 에탄올(EDS7)추출물은 500  $\mu$ g/mL농도에서 96.3%, 600  $\mu$ g/mL 농도에서 96%,

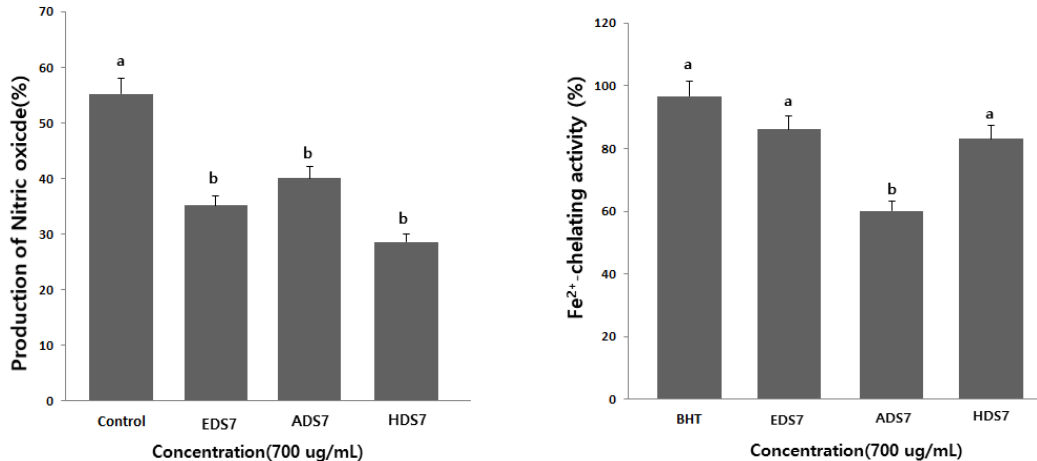


**Fig. 1. Effect of the ethanol (EDS7), acetone (ADS7), hot-water (HDS7) extracts of 7 Steamed *Codonopsis lanceolata* on the cell viability of RAW264.7 cells.** The viability of cells was measured with MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance. Results are mean $\pm$ S.D. of triplicate data.

700  $\mu$ g/mL 농도에서 95.2%를 나타내었다. 아세톤(ADS7)추출물은 500  $\mu$ g/mL 농도에서 95.8%, 600  $\mu$ g/mL농도에서 96.1%, 700  $\mu$ g/mL 농도에서 95.6%를 나타내었으며, 열수 추출물(HDS7)은 500  $\mu$ g/mL 농도에서 96.8%, 600  $\mu$ g/mL 농도에서 97%, 700  $\mu$ g/mL 농도에서 97.3%를 나타내었다. 각각의 추출물은 500, 600, 700  $\mu$ g/mL 농도에서 대조군 평균 97.5%와 비교 시 세포독성을 나타내지 않았다. 각각의 농도에서 열수 추출물(HDS7)이 에탄올추출물(EDS7) 및 아세톤 추출물(ADS7)보다 세포 생존율이 높았다. 세포독성 실험결과 7회 증숙 용매별 추출물이 향후 인체 및 식품에 적용시 안전성과 고농도까지 사용이 가능하여 향후 각종 바이오 소재로 이용 시에도 사용 될 수 있을 것으로 생각된다.

### 2. Nitrite oxide 생성 억제 활성 및 철 이온( $\text{Fe}^{2+}$ )에 대한 chelating 효과 측정

7회 증숙 용매별 추출물을 세포독성 실험 결과 중 가장 높은 농도(700  $\mu$ g/mL)와 염증 유발물질인 LPS를 투여하여 용매별 추출물이 RAW 264.7 세포내에 LPS에 의해 생성되는 NO의 저해 효과를 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. RAW264.7 세포에 LPS를 1.0  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 대조군에서의 NO 농도는 55.2  $\mu$ M로 크게 증가하였다. 700  $\mu$ g/mL로 처리한 실험군의 NO 생성은 에탄올 추출물(EDS7) 35.2  $\mu$ M, 아세톤 추출물(ADS7) 40.1  $\mu$ M 및 열수 추출물(HDS7) 28.8  $\mu$ M로 대조군과 비교 시 NO 생성의 저해효과가 나타났으며, 그 중 HDS7(열수 추출물)의 경우 NO의 생성은 대조군에 비해 유의적인 저해 활성을 보였다. NO는 염증 매개인자로서의 작용 및 일부는 diazoalkane으로 전환되어 암 등 질병을



**Fig. 2.** Reducing activity of LPS-induced NO production in RAW264.7 cells and Fe<sup>2+</sup> chelating activity of the ethanol (EDS7), acetone (ADS7), hot-water (HDS7) extracts of 7 steamed *Codonopsis lanceolata*. Results are mean±S.D. of triplicate data. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

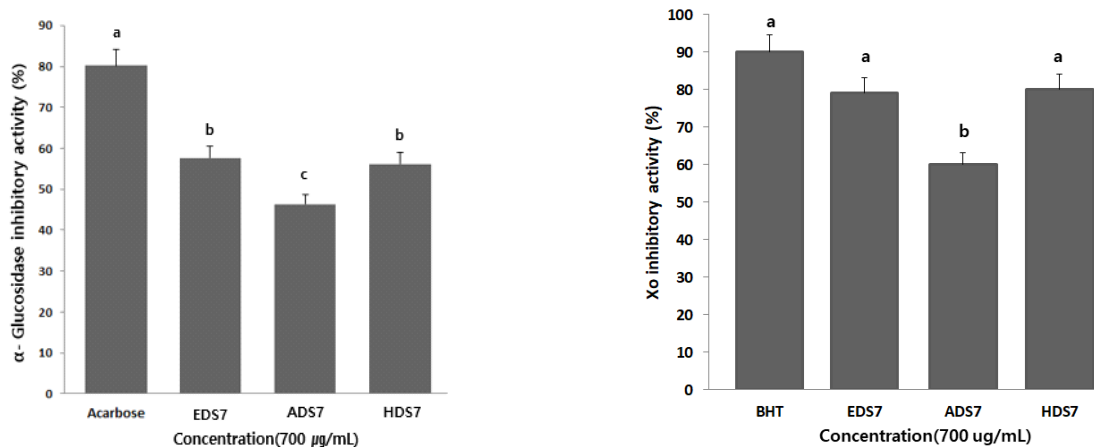
유발하는 원인으로도 알려져 있으며 인체 내 NO의 농도를 유지하는 것은 매우 중요하다(Hsieh 등 2014). 식물의 추출물에서의 NO 생성억제효과는 ROS의 생성을 억제시킬 수 있는 항산화력과 관련이 있으며, 폴리페놀류 및 플라보노이드류 등의 성분으로 인한 것이 보고되었다(Kim 등 2010; Link 등 2010; Song 등 2012; Kang & Kim 등 2015). Lee 등(2021)은 횃수를 달리한 증숙 더덕추출물의 총폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량의 차이에 따른 항산화 및 항염증 효과가 있음을 보고하였고, 본 실험에서도 7회 증숙 용매별 추출물 NO 생성 저해 효과가 관찰되었다.

7회 증숙 더덕의 EDS7, ADS7 및 HDS7의 700 µg/mL 농도에서 철 이온 제거능은 각각 79.3%, 58.9% 및 82.2%로 나타났으며, 양성 대조군으로 사용한 BHT 96.6%와 비교시 HDS7(열수 추출물)에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 본 실험 결과에서 7회 증숙 용매별 추출액은 용매의 종류와 농도의 차이는 보였지만 모든 시료에서 금속이온 chelating 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 생체 내의 Fe<sup>2+</sup>이온은 과잉 시 지질과산화물 및 과산화수소의 생성을 촉진시켜 세포의 직접적인 손상이나 노화 및 DNA 산화적 스트레스를 일으키므로 chelating 활성이 높을수록 hydroxyl radical의 억제와 지방 산화의 반응작용을 감소시킬 수 있다(Stoys & Bagchi 1995; Su 등 2007). Lee 등(2021)은 횃수를 달리한 증숙더덕 추출물의 라디칼 소거능을 검토한 연구에서 폴리페놀 및 플라보노이드류의 함량이 많은 분획물이 현저히 높은 것을 보고하였으며, 추출 용매는 다르지만 철 이온(Fe<sup>2+</sup>)에 대한 chelating 효과도 같은 원인으로 생각된다.

### 3. α-Glucosidase 및 xanthine oxidase 저해활성

α-Glucosidase 저해활성으로 살펴본 항당뇨 효과에 대한 비교·분석 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 당뇨병은 고혈당 상태가 지속되는 질환으로 다양한 합병증으로 인한 사망률이 높은 대사 질환이다(Kim 등 2013). 소장 점막의 α-glucosidase는 전분을 단당으로 분해하여 혈당을 높이며, acarbose과 같은 α-glucosidase 저해제는 탄수화물의 흡수를 지연시켜 식후 혈당 상승을 완만하게 하지만 다양한 부작용이 존재한다고 알려져 있다(Puls 등 1984; Kim 등 2011). 본 연구결과의 7회 증숙 추출물의 α-glucosidase 저해효과는 700 µg/mL 에탄올 추출물(EDS7)에서는 57.7%로 저해활성이 가장 높았고, 아세톤 추출물(ADS7)은 46.37%와 열수추출물(HDS7)은 56.1%의 활성을 나타냈다. 이는 Lee 등(2021)의 연구 결과에서처럼 증숙더덕의 용매별 추출물에서의 폴리페놀류가 혈당조절 완화에 유용한 작용을 한 것으로 생각되며, polyphenol류의 α-glucosidase 저해효과 및 항당뇨 효과에 관한 많은 연구가 보고가 있다(Farkas L 1980; Andrade-Cetto & Wiedenfeld 2001; Vertichevan & Jegadeesan 2002). 이는 부작용이 적은 식후 혈당 강하의 효능이 있는 천연물 소재에 관한 연구에 도움이 될 것으로 생각된다.

7회 증숙 더덕의 용매별 추출물과 양성대조구인 BHT와 비교하여 xanthine oxidase 저해활성을 Fig. 3에 나타내었다. 7회 증숙 더덕의 에탄올 추출물(EDS7)에서는 79.2%, 아세톤 추출물(ADS7)은 60.2% 및 열수 추출물(HDS7)은 80.1%로 나타내었다. 산화적 스트레스에 의한 당뇨병의 발생 기전이 제시되었고(Giugliano 등 1996) 또한 당뇨병으로 유발된 염증반응은 활성산소의 생성과 제거의 불균형을 유발하고 조직을

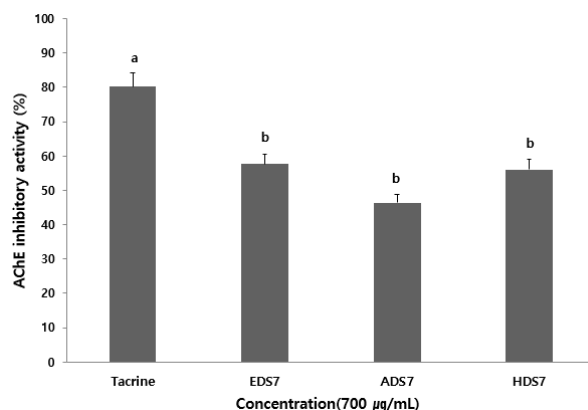


**Fig. 3.**  $\alpha$ -Glucosidase and Xanthine oxidase inhibitory activities of the ethanol (EDS7), acetone (ADS7), hot-water (HDS7) extracts of 7 steamed *Codonopsis lanceolata*. Results are mean $\pm$ S.D. of triplicate data. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

손상시키며 합병증을 유발하는 등 인체에 위험 요인이 된다 (Jeong 등 2010; Youn & Kim 2012). 본 실험의 증숙 더덕의 용매별 추출물에서 나타난 xanthine oxidase의 저해 활성은 추출물의 polyphenol류 때문인 것으로 생각된다. 항산화 효능을 증진시키는 phytochemical의 생리활성물질에 관한 항산화성 연구로 체내의 활성산소종을 제거하여 항산화 기전을 보호 한다는 연구가 있다(Hunt 등 1988; Lee 등 2012).

#### 4. 아세틸콜린에스테라아제 효소의 활성 측정

AChE(acetylcholinesterase) 활성이 증가되어 acetylcholine (ACh)이 분해되어 콜린 기능이 결손되면 인지능이 악화되는 알츠하이머질환이 발생된다(Younkin 등 1986). ACh의 분해를 막고 농도를 유지하는 AChE inhibitor가 치료제로 사용되고 있다(Talesa VN 2001). 현재 AD 치료제로 rivastigmine, donepezil, tacrine 등이 사용되고 있으며(Figueiró 등 2010), 천연물을 이용하여 AChE inhibitor를 탐색하여 알츠하이머 질환을 치료하려는 연구가 수행되고 있다(Choi 등 2017). 이에 본 연구에서는 7회 증숙한 더덕의 700  $\mu\text{g/mL}$  농도의 용매별 추출물의 기억력 효능을 확인하기 위해 AChE 저해 활성을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 에탄올 추출물(EDS7)은 62.1%, 아세톤 추출물(ADS7)은 34.57%, 열수 추출물(HDS7)은 70.2%의 저해 활성을 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 tacrine과 비교시 각 용매 추출물은 유의적인 결과는 나타내지 못하였으나 열수 추출물(HDS7)에서 가장 높은 저해 활성을 나타내었다. 더덕의 증숙 과정에 따른 폴리페놀 성분이 scopolamine으로 유도된 기억력 손상에 대해 인지능 개선 활성에 효과 있다고 Weon 등(2014)에 의해 보고되었으며, 이는 Lee 등(2021)의 연구결과와 같이 7회 증숙과정을 통



**Fig. 4.** Inhibitory effects against AChE of the ethanol (EDS7), acetone (ADS7), hot-water (HDS7) extracts of 7 Steamed *Codonopsis lanceolata*. Results are mean $\pm$ S.D. of triplicate data. Different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

한 더덕의 총 페놀함량 및 플라보노이드류 증가로 생각되며 AChE 저해 활성은 항산화적 활성기전과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

#### 요약 및 결론

본 연구에서는 이전의 연구결과를 바탕으로 증숙의 횟수를 7회 반복한 더덕의 용매별 추출물을 선택하여 에탄올 추출물(EDS7), 아세톤 추출물(ADS7) 및 열수 추출물(HDS7)을 사용하여 500, 600, 700  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위에서 세포독성을 나타내지 않았다. NO 생성 억제활성은 각각의 용매별 추출

물이 700 µg/mL의 농도에서 가장 억제 활성이 좋았고 그중 아세톤 추출물(ADS7)에서 40.1 µM로 NO 생성의 저해효과가 가장 높게 나타났다. 철 이온에 대한 chelating 효과는 700 µg/mL농도의 열수 추출물(HDS7)에서 82.2%의 활성을 나타내었으며, α-glucosidase 저해 활성은 700 µg/mL 에탄올 추출물(EDS7)에서 57.7%로 저해활성이 가장 높았다. Xanthine oxidase 저해활성은 열수 추출물(HDS7)이 80.1%로 가장 높은 활성을 나타내었다. AChE저해 효과는 각 추출물 처리군에서 유의적인 결과는 나타내지 않았으나 열수 추출물(HDS7)에서 70.2%로 저해 활성을 나타내었다. 본 연구를 통해 7회 증숙의 용매별 추출물에 따른 기능성을 확인 하였으며 기능성 식품소재로의 이용가치가 기대된다.

## 감사의 글

이 논문은 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음(2020).

## References

- Byeon SE, Choi WS, Hong EK, Lee J, Rhee MH, Park HJ, Cho JY. 2009. Inhibitory effect of saponin fraction from *Codonopsis lanceolata* on immune cell-mediated inflammatory responses. *Arch Pharm Res* 32:813-822
- Cetto AA, Wiedenfeld H. 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 78:145-149
- Choi JS, Song BM, Park HJ. 2017. Identification of the component with anti-acetylcholinesterase activity from the essential oil of *Artemisia iwayomogi*. *Korean J Plant Resour* 30:17-21
- Citron M. 2002. Alzheimer's disease: Treatments in discovery and development. *Nat Neurosci* 5:1055-1057
- Dario G, Antonio G, Giuseppe P. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Farkas L. 1980. Active principles of plants of traditional medicine as models of new drugs. *J Ethnopharmacol* 2: 145-148
- Figueiró M, Ilha J, Pochmann D, Porciúncula LO, Xavier LL, Achaval M, Nunes DS, Elisabetsky E. 2010. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama). *Phytomedicine* 17:956-962
- Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. 1998. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27:940-944
- Han J, Miyamae Y, Shigemori H, Isoda H. 2010. Neuroprotective effect of 3,5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1. *Neuroscience* 169:1039-1045
- Hong HD, Kim YC, Rho JH, Kim KT, Lee YC. 2007. Changes on physicochemical properties of *Panax ginseng* C. A. Meyer during repeated steaming process. *J Ginseng Res* 31:222-229
- Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AHH, Wang DL. 2014. Shear-induced endothelial mechanotransduction: The interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci* 21:3
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256:205-212
- Ichikawa M, Ohta S, Komoto N, Ushijima M, Kodera Y, Hayama M, Shirota O, Sekita S, Kuroyanagi M. 2009. Simultaneous determination of seven saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Nat Med* 63:52-57
- Jeong JH, Lee JW, Kim KS, Kim JS, Han SN, Yu CY, Lee JK, Kwon YS, Kim MJ. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts from a medicinal plant, sea buckthorn. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53:33-38
- Kang DH, Kim MY. 2015. Comparative phenolic composition and antioxidant properties of honey and honeycomb extracts. *J Life Sci* 25:1169-1175
- Kang MK, Kim JS, Kim GC, Choi SY, Kim KM. 2015. Evaluation of physicochemical properties and enhancement of antioxidant activities of *Dioscorea batatas* by stepwise

- steaming process. *J East Asian Soc Diet Life* 25:1049-1057
- Kim HJ, Han CH, Kim NY, Lee EK, Lee KN, Cho HE, Choi YH, Chong MS. 2010. Effect of garlic extracts with extraction conditions on antioxidant and anticancer. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24:111-117
- Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM. 2011. Screening of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon-do wild plants extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:308-315
- Kim KY, Nam KA, Kurihara H, Kim SM. 2008. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* 69:2820-2825
- Lee ES, Kum JY, Hwang YO, Tu OJ, Jo HB, Kim JH, Chae YZ. 2012. Comparative study on antioxidant capacities and polyphenolic contents of commercially available cocoa-containing products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1356-1362
- Lee JH. 2002. Immunostimulative effect of hot-water extract from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage. *Korean J Food Sci Technol* 34:732-736
- Lee HK, Choi OY, Choi DK, Choi HS. 2021. Antioxidative and antimicrobial effects of ethanol extract of *Codonopsis lanceolata* by steaming times. *Korean J Food Nutr* 34:107-113
- Link A, Balaguer F, Goel A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 80:1771-1792
- Maeng YS, Park HK. 1991. Antioxidant activity of ethanol extract from Dödök (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Sci Technol* 23:311-316
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreasen N, Wallin A, Westman-Brinkmalm A, Blennow K. 2006. An Alzheimer's disease-specific  $\beta$ -amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 409:215-219
- Puls W, Krause HP, Müller L, Schutt H, Sitt R, Thomas G. 1984. Inhibitors of the rate of carbohydrate and lipid absorption by the intestine. *Int J Obes* 8:181-190
- Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem* 89:569-575
- Shim KS, Park GH, Choi CJ, Na CS. 2004. Decreased triglyceride and cholesterol levels in serum, liver and breast muscle in broiler by the supplementation of dietary *Codonopsis lanceolata* root. *Asian-Australas J Anim Sci* 17:511-513
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ, Lee HY. 2012. Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Korean J Med Crop Sci* 20:238-244
- Stirpe F, Della Corte E, Lorenzoni E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244:3855-3863
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18:321-336
- Su L, Yin JJ, Charles D, Zhou K, Moore J, Yu L. 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem* 100:990-997
- Talesa VN. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122:1961-1969
- Vertichelvan T, Jegadeesan M. 2002. Anti-diabetic activity of alcoholic extract of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schultes in rats. *J Ethnopharmacol* 80:103-107
- Weon JB, Yun BR, Lee J, Eom MR, Ko HJ, Lee HY, Park DS, Chung HC, Chung JY, Ma CJ. 2014. Effect of steamed *Codonopsis lanceolata* on spatial learning and memory in mice. *Korean J Pharmacogn* 45:48-54
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem* 79:307-313
- Youn KS, Kim JW. 2012. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of extracts from mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit subjected to different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:1388-1394
- Younkin SG, Goodridge B, Katz J, Lockett G, Nafziger D, Usiak MF, Younkin LH. 1986. Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. *Fed Proc* 45:2982-2988

Received 24 May, 2021  
 Revised 07 June, 2021  
 Accepted 11 June, 2021