

## 십전대보탕 발효물의 성분 분석 및 뇌신경 세포 보호 활성

양혜진 · 원진배 · 마진열\* · 마충재#

강원대학교 생물소재공학전공, \*한국한의학연구원

(Received January 6, 2011; Revised February 26, 2011; Accepted March 1, 2011)

### The Study on Compounds of the Fermented Sipjundaebotang and its Neuroprotective Activity

Hye Jin Yang, Jin Bae Weon, Jin Yeul Ma\* and Choong Je Ma#

Department of Biomaterials Engineering, Division of Bioscience and Biotechnology,  
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

\*TKM Converging Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** — Sipjundaebotang was a well-known restorative traditional herbal prescription that used to treat anemia, anorexia, fatigue and inflammation. In this study, we examined the bioconversion of compounds in the Sipjundaebotang (SJ) and fermented Sipjundaebotang with *Lactobacillus fermentum* KFRI 164 (FSJ) using established HPLC-DAD method. The chromatogram of FSJ has shown that the contents of six bioactive compounds 5-HMF, paeoniflorin, ferulic acid, cinnam aldehyde, decursin, glycyrrhizin in SJ has decreased. And the contents of unknown compounds (1), (2), (3), (4) and (5) in FSJ were higher than each contents of SJ. The antioxidant activities of SJ and FSJ were conducted by DPPH free radical and Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) scavenging assay. Electron donating activity (EDA, %) value of FSJ has shown higher than 21.9% and 14.5% at a concentration of 0.5 mg/ml for DPPH radical scavenging activity and  $H_2O_2$  scavenging activity, respectively. Also, the neuroprotective activities of SJ and FSJ against glutamate-induced oxidative stress in a mouse hippocampal cell line (HT22) were evaluated by MTT assay. As a result, FSJ has shown higher neuroprotective activity than 56.5% comparing with SJ. In conclusion, the fermented SJ using microorganism could convert compounds in SJ and enhance antioxidant activity and neuroprotective activity.

**Keywords** □ antioxidant activity, bioconversion, fermentation, HPLC, neuroprotection, Sipjundaebotang

체내의 산소가 물리, 화학적 요인 및 환경적 요인 등에 의하여 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), superoxide radical( $O_2^-$ ) 등과 같은 반응성이 큰 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환되면, 세포 내 DNA, 지질, 단백질 등에 대한 기능장애 작용을 하여 생체에 인체 내 치명적인 산소독성을 일으킨다. 최근에 이러한 활성 산소종에 의해 유발되는 산화적 스트레스가 알츠하이머병, 파킨슨병, 허팅턴병 등과 같은 퇴행성 뇌신경 질환의 중요한 요인으로 알려지면서 산화적 스트레스에 의한 세포 독성으로부터 세포 보호 활성을 보이는 새로운 뇌신경 보호 활성 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>1-5)</sup>

Glutamate는 중추신경계의 주요 흥분성 신경전달물질(excitatory neurotransmitter)로 뇌가 손상을 받으면 glutamate

는 세포 내 유입이 감소되고 상대적으로 세포 외 농도가 증가하게 된다. Glutamate의 농도가 증가함에 따라 독성이 유발되면서 경쟁적으로 cysteine의 흡수가 억제된다. 이에 따라 glutathione (GSH)의 농도가 감소하게 되고 ROS는 점점 과잉 촉진되면서 산화적 스트레스를 초래하게 된다.<sup>6-8)</sup>

한방제제는 오랜 세월 동안 다양한 질병의 예방 및 치료를 목적으로 사용되어왔다. 한방제제는 상대적으로 인체 내 부작용이 적으며 구성 생약재 성분의 복합적 상호작용에 의해 다양한 효능을 나타내는 장점이 있어 최근 한방제제에 대한 관심과 수요가 크게 증가하고 있다.<sup>9,10)</sup> 십전대보탕은 이러한 한방제제의 하나로 예로부터 원기회복제로 널리 알려져 있다. 뿐만 아니라 혈액순환을 촉진하며, 식욕부진 및 빈혈 치료제로도 사용되고 있다. 최근에는 산화적 손상에 대한 뇌신경 세포에서의 세포 보호 활성 연구가 보고 되어 있다.<sup>11-13)</sup> 대한약전외한약 생약 규격집에 따르면 십전대보탕은 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer), 백출(*Atractylodes japonica* Koidz.), 복령(*Poria cocos* Wolf), 당귀

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 033-250-6565 (팩스) 033-253-6560  
(E-mail) cjma@kangwon.ac.kr

(*Angelica gigas* Nakai), 천궁(*Cnidium officinale* Makino), 숙지황(*Rehmannia glutinosa*), 생강(*Zingiber officinale* Roscoe), 대추(*Zizyphus jujube* var. *inermis* Mill.), 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.), 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge), 육계(*Cinnamomum cassia* Blume.), 그리고 감초(*Glycyrrhiza glabra* L.)로 구성되어 있다.

발효를 통한 생물전환은 한방제제 및 생약의 생리활성물질을 다른 형태로 전환시키거나 새로운 형태의 물질을 생성할 수 있으며, 더불어 한방제제 및 생약의 효능을 향상시킬 수 있다.<sup>14-16)</sup> 이에 본 연구에서는 십전대보탕을 발효 균주, *Lactobacillus fermentum* KFRI 164를 이용하여 발효시킨 후, 확립된 십전대보탕 HPLC 동시 분석법에 적용하여 십전대보탕의 8종 지표성분의 함량 변화를 발효 전과 비교 분석하였다. 8종 지표성분은 십전대보탕을 구성하는 12종의 생약의 지표 성분 중, 5-HMF(숙지황), paeoniflorin(작약), ferulic acid(천궁), cinnamaldehyde(육계), decursinol(당귀), 6-gingerol(생강), decursin(당귀), glycyrrhizin(감초)을 선정하였다(Fig. 1). 그리고 발효에 의한 생물전환 전후의 십전대보탕의 산화적 스트레스에 대한 뇌신경세포 보호 활성 및 항산화 활성을 비교하여 십전대보탕의 효능을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 시료

본 연구에 사용한 십전대보탕 시료(3.0 g)와 십전대보탕의 발효에 이용한 균주, *Lactobacillus fermentum* KFRI 164는 각각 한국한의학연구원과 한국식품개발원으로부터 확보하였다. HT22 cells는 서울대학교로부터 분양 받아 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco (Invitrogen Co., USA)로부터 구입하였다. 활성 검색에 사용된 L-glutamic acid monosodium salt hydrate(Glutamate), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 2,2-diphenyl-1-pikryl-hydrazyl(DPPH), 2,2-azinobis(3-ethylbenthiazolin)-6-sulfonicacid(ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trolox) 그리고 (+)-sodium L-ascorbate는 모두 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였다. 분석에 사용된 지표 성분 중에서 hydroxymethylfurfural (5-HMF), ferulic acid 그리고 cinnamaldehyde은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 그리고 6-gingerol, decursin 및 glycyrrhizin은 식품의약품안전청으로부터 확보하였으며,

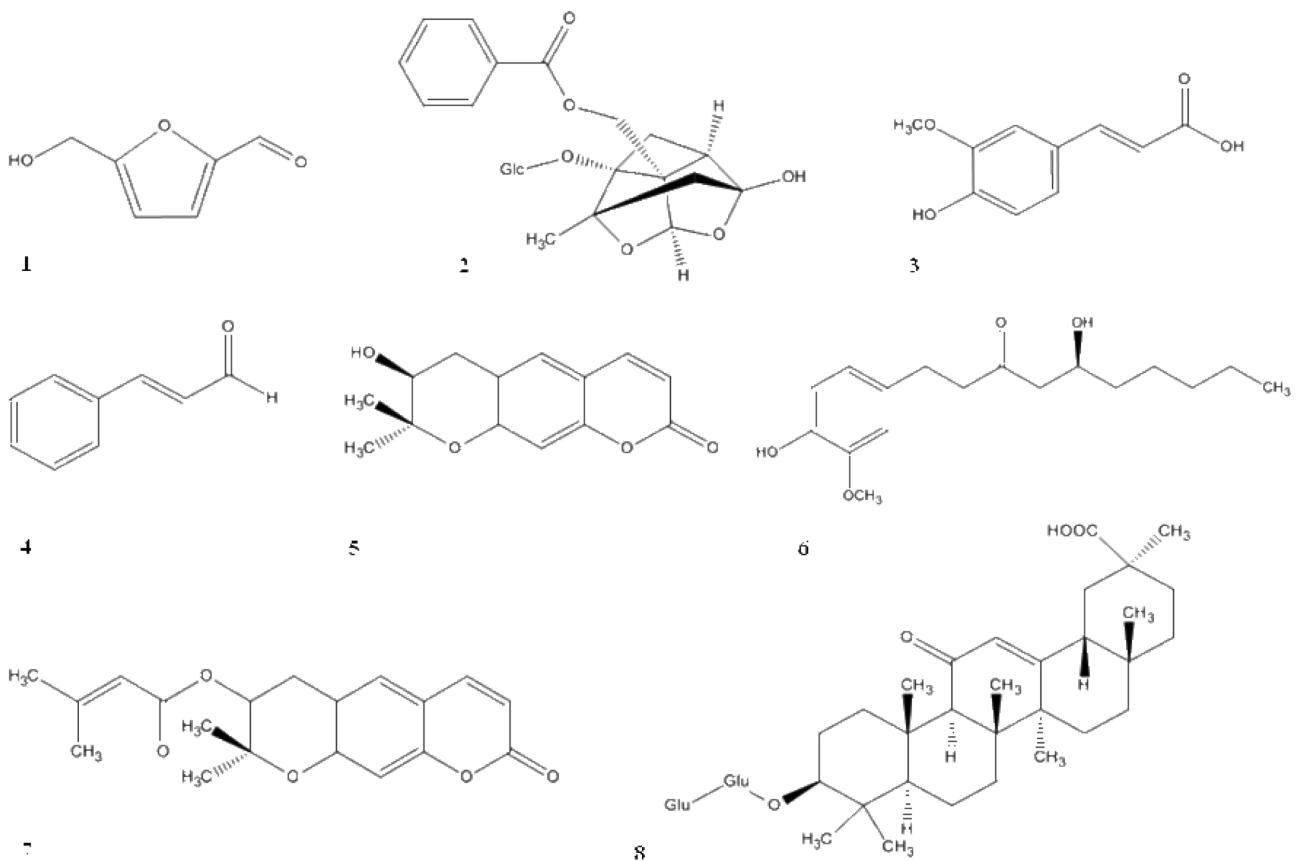


Fig. 1 – The chemical structures of eight bioactive compounds in Sipjundaebotang. (1) hydroxymethylfurfural (5-HMF), (2) paeoniflorin, (3) ferulic acid, (4) cinnamaldehyde, (5) decursinol, (6) 6-gingerol, (7) decursin and (8) glycyrrhizin, respectively.

paeoniflorin과 decursinol은 각각 Wako(Japan)와 (주)엘컴사이언스에서 구입하였다. 각 지표 성분의 순도는 97% 이상을 나타냈다. HPLC 분석을 위한 water와 methanol은 HPLC용 특급 용매로, trifluoroacetic acid(TFA)는 분석용 등급의 용매로 각각 J.T. Baker(USA)와 (주)대정화금에서 구입하였다.

### 십전대보탕 발효 조건

*Lactobacillus fermentum* KFRI 164를 MRS(de Man, Rogosa and Sharp) broth 배지에 접종한 후 37°C 환경에서 24시간 동안 2회 계대 배양 한 후, 이를 각각의 broth 배지에 접종하여 위와 동일한 환경에서 배양하였다. 초기균를  $1\sim5\times10^7$  CFU/ml로 맞춰 헤석하여 발효균으로 사용하였다. 발효에 사용된 십전대보탕은 물 추출물로 1M NaOH를 이용하여 pH 8.0으로 조절한 후, 121°C 환경에서 15분 동안 고압 멸균 처리한 다음 식혀주었다. 멸균된 십전대보탕 750 ml에 7.5 ml의 발효균을 접종하여 48시간 동안 37°C에서 배양하였다.

### 생물전환을 이용한 십전대보탕의 HPLC 분석

본 연구에 사용한 HPLC는 Dionex사의 시스템으로, pump(LPG 3X00), auto sampler(ACC-3000), column oven(TCC-3000SD), diode array UV/VIS detector(DAD-3000(RS))로 구성되어 있다. 분석은 SHISEIDO C<sub>18</sub> column(5 μm, 250×4.60 mm)을 사용하여 수행되었으며, column의 온도는 35°C를 유지하였다. 이동상으로는 water(A)와 0.1% trifluoroactic acid(TFA) methanol(B)을 이용하였으며, 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. 최적화된 이동상의 조건은 Table I에 제시되어 있다. UV 파장 검출의 각 지표 성분의 최대 UV 흡수 파장 값을 바탕으로 하여 paeoniflorin, 6-gingerol, 그리고 decursin은 230 nm, glycyrrhizin은 254 nm, 5-HMF는 280 nm, ferulic acid, cinnamaldehyde 그리고 decursinol은 300 nm로 설정하여 각 지표 성분의 해당 파장에서의 피크 면적 값을 측정하였다. 분석에 사용된 십전대보탕 시료는 무게를 정확히 청량하여 60% methanol에 10 mg/ml의 농도로 녹인 후, 0.45 μm membrane filter를 사용하여 여과한 뒤 20 μl씩 주입하여 분석하였다.

Table I – Mobile phase condition of chromatographic separation

Time (min)	Solvent	
	A <sup>a</sup> (%)	B <sup>b</sup> (%)
0	90	10
20	70	30
45	50	50
55	30	70
65	25	75
65	90	10

<sup>a</sup>A: Water.

<sup>b</sup>B: 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) MeOH.

### DPPH free radical 소거 활성 평가

DPPH free radical 소거법을 실시하여 십전대보탕의 항산화 활성을 평가하였다. 여섯 가지 농도(0.25, 0.35, 0.50, 0.75, 1.00 그리고 1.25 mg/ml)의 십전대보탕 시료 용액 150 μl에 0.4 mM DPPH 용액 150 μl을 처리하여, 실온의 암실에서 반응시켰다. 30분 간 반응시킨 후, micro plate reader를 사용하여 517 nm에서 OD(optical density) 값을 측정하였다.<sup>17)</sup> 십전대보탕의 DPPH free radical 소거활성은 EDA%(Electron donating activity)값으로 평가하였다. EDA(%) 값은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{EDA}(\%) = [1 - (\text{OD sample}/\text{OD control})] \times 100$$

### Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거 활성 평가

십전대보탕의 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거 활성은 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonicacid(ABTS)-peroxidase 평가법을 사용하여 측정하였다.<sup>18)</sup> 여섯 가지 농도(0.25, 0.35, 0.50, 0.75, 1.00 그리고 1.25 mg/ml)의 십전대보탕 시료 용액 80 μl에 10 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 μl와 0.1 M의 phosphate buffer(pH 5.0) 100 μl를 넣은 후 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후 1.25 mM ABTS 용액 30 μl와 1 U/ml의 peroxidase 30 μl를 넣고 37°C에서 10분 간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 405 nm에서 OD값을 측정하였다. 십전대보탕의 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거 활성은 EDA(%) 값을 통해 평가하였다.

### HT22 세포배양 및 뇌신경세포 보호 활성 평가

생쥐 해마 유래 세포주인 HT22 cell은 glutamate로 유도된 뇌 신경 질환의 기전을 연구하는 모델로 널리 사용되고 있다.<sup>19,20)</sup> HT22 세포의 보호 활성 평기는 glutamate로 인해 유발된 독성에 대한 세포 보호 활성 정도를 측정하는 것으로, MTT assay를 통해 실시하였다. 생쥐 해마 유래 세포주인 HT22 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다. HT22 세포를 48 well plate에 6.7×10<sup>4</sup> cells/well로 각 300 μl씩 분주하여 24시간 배양한 후 십전대보탕 시료(10, 100 μg/ml)와 trolox를 30 μl씩 처리하였으며, 1시간 배양 후 glutamate 30 μl씩 처리하였다. 이때 trolox는 positive control로써 사용되었다. 24시간 배양 후에 MTT assay를 시행하여 micro plate reader를 사용하여 570 nm에서 OD값을 측정하였다. glutamate에 대한 뇌신경세포 보호 활성은 relative protection(%)로 나타내었다. 통계처리는 ANOVA test를 적용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 생물전환을 이용한 십전대보탕의 성분 분석

HPLC-DAD를 이용한 십전대보탕(Sipjundaebotang, SJ)과

Table II – Contents of eight bioactive compounds in SJ and FSJ

	Contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	
	SJ	FSJ
5-HMF	5.60±0.007	3.59±0.005
Paeoniflorin	6.13±0.002	1.33±0.001
Ferulic acid	0.31±0.001	0.23±0.004
Cinnamaldehyde	0.16±0.010	0.01±0.004
Decursinol	0.05±0.002	0.05±0.001
6-gingerol	0.08±0.001	0.08±0.003
Decursin	0.69±0.002	0.50±0.002
Glycyrrhizin	1.33±0.002	1.23±0.002

*Lactobacillus fermentum* KFRI 164에 의해 발효된 십전대보탕(fermented Sipjundai-tang, FSJ)의 8종의 지표 성분 함량의 분석 결과는 Table II에 제시되어 있다. 발효 전 SJ의 지표 성분 함량과 비교하였을 때, FSJ의 8종의 지표 성분 중 decursinol과 6-gingerol을 제외한 6종의 지표 성분의 함량이 7.5~93.8% 감소하였다. 그 밖에도 SJ와 FSJ의 HPLC chromatogram을 비교한 결과 FSJ의 unknown compounds (1), (2), (3), (4), (5)가 SJ과 비교 시 성분 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 근거로 미생물을 이용한 생물전환을 통하여 SJ의 일부 생리활성 물질이 새로운 형태의 화합물로 전환된 것으로 판단된다(Fig. 2).

#### DPPH free radical 소거 활성 평가

안정화된 free radical인 1,1-diphenyl-2-picylhydrazyl(DPPH)은 수소공여체와 반응하여 전자를 내어주면서 소거된다. DPPH

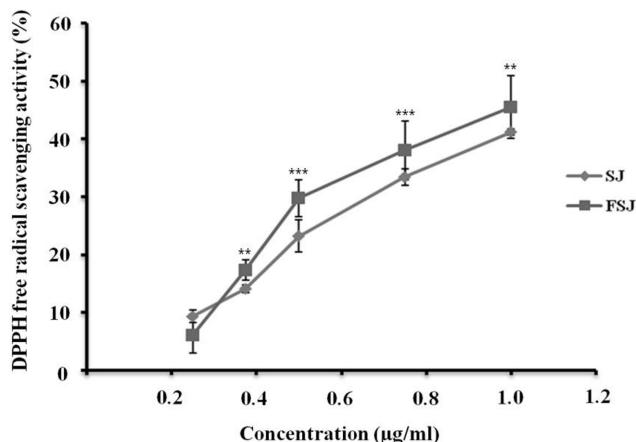


Fig. 3 – DPPH free radical scavenging activity (%) of SJ and FSJ.

free radical 소거 활성법은 이러한 원리를 이용하여 자색의 DPPH가 탈색되는 정도를 측정하여 시료의 항산화 능력을 평가하는 방법이다. SJ와 FSJ에 대한 DPPH free radical 소거 활성은 Fig. 3에 제시되어 있다. 실험 결과 SJ와 FSJ 모두 농도 의존적인 소거 활성을 보였으며, EDA(%) 값을 비교하였을 때 FSJ가 최대 21.9%(0.5 mg/ml) 더 높은 DPPH free radical 소거 활성을 보였다.

#### Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 소거 활성 평가

인체 내 DNA의 손상 및 세포의 지질파산화를 촉진시켜 노화를 유발하는 것으로 알려져 있는 Hydrogen peroxide의 소거 정

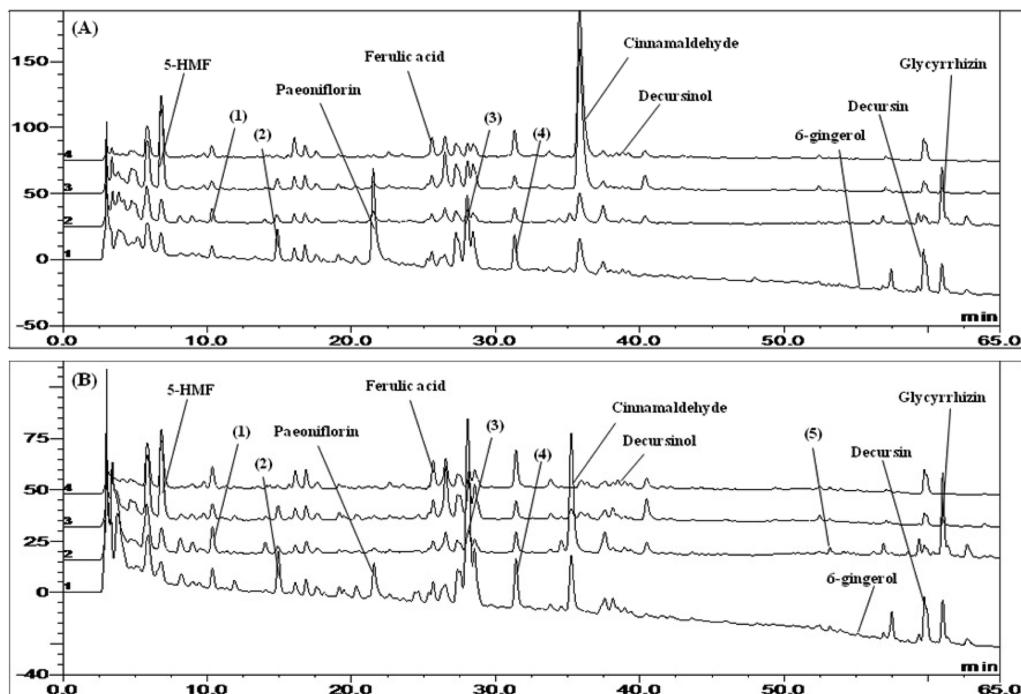


Fig. 2 – The HPLC chromatogram of SJ (A) and FSJ (B). (1=230 nm, 2=254 nm, 3=280 nm and 4=300 nm).

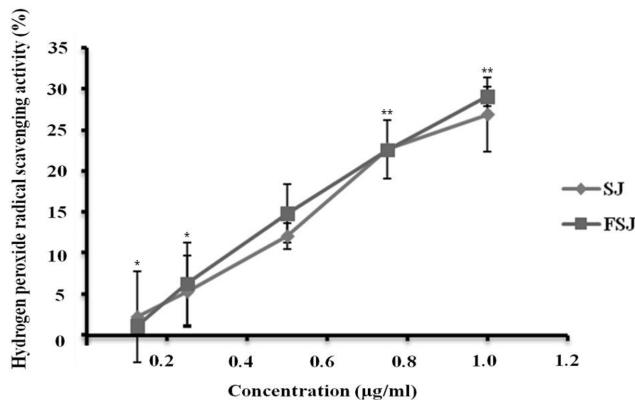


Fig. 4 – Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) free radical scavenging activity (%) of SJ and FSJ.

도를 측정하여 SJ와 FSJ의 항산화능을 평가하였다(Fig. 4). EDA(%) 값을 비교한 결과 FSJ가 SJ보다 최대 14.5%(0.5 mg/ml) 더 높은 Hydrogen peroxide 소거 활성을 보였으며, SJ와 FSJ 모두 농도 의존적인 소거 활성을 나타내었다.

이처럼 본 연구의 free radical 소거 활성 실험에서 FSJ가 SJ보다 높은 항산화 활성을 나타냈다. 따라서 생물전환 과정을 통해 전환된 성분들에 의해 항산화 활성이 증가한 것으로 판단된다.

#### HT22 세포배양 및 뇌세포 보호 활성 평가

SJ와 FSJ의 glutamate에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 HT22 세포의 보호 활성을 평가하기 위하여, MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 SJ는 glutamate 단독 처리 대조군과 비교하였을 때 세포 보호 활성을 보이지 않았으나, FSJ는 100 µg/ml에서 56.5%의 높은 세포 보호 활성을 나타내었다(Fig. 5). 본 연구 결

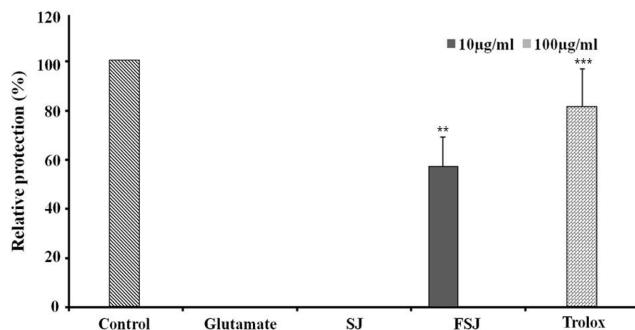


Fig. 5 – The neuroprotective effects of SJ and FSJ on glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells. HT22 cells were treated with SJ and FSJ at concentration of 10 and 100 µg/ml, and then incubated for 24 h with glutamate (2 mM). Trolox (50 µM) that was used for positive control exhibited relative protective activity ( $80.97 \pm 16.04\%$ ). Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. SJ (ANOVA).

과 발효 과정에서 생리활성물질이 전환되거나 생성됨으로써 FSJ 가 SJ와 비교 시 높은 세포 보호 활성을 나타나는 것으로 판단된다.

#### 결 론

예로부터 원기회복제로 널리 사용되어 온 십전대보탕은 최근 연구에서 신경교세포주인 C6 glioma cell에서 산화적 스트레스에 의한 신경주세포주의 사멸 보호 효과와 glutamate에 의한 쥐 위 뇌피증 세포보호 활성이 보고되어 치매와 같은 퇴행성 뇌질환 치료 효과에 대한 가능성을 가지고 있다.<sup>12,13)</sup> 또한 쥐를 통한 십전대보탕에 대한 독성 연구결과 안전한 물질로 보고 되었다.<sup>21,22)</sup> 본 연구에서는 십전대보탕에 대한 활성을 향상시키기 위한 방법으로 발효균주, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 164를 통해 생물전환하였고 십전대보탕 발효 제제와 비교하여 성분변화, 항산화 활성 및 뇌신경세포 보호 활성이 대해 분석하였다. HPLC-DAD 분석법을 이용하여 SJ와 FSJ의 8종 지표성분의 함량을 비교한 결과, 미생물을 이용한 생물전환에 의해 SJ의 생리활성물질이 새로운 화합물로 전환되거나 생성된 것으로 나타났다. 항산화 활성 및 뇌신경세포 보호 활성 평가를 통해 SJ와 FSJ의 생리활성을 비교 분석하였고, FSJ의 뇌신경세포 보호 활성과 항산화 활성이 SJ보다 증가하였다. 결론적으로 발효 과정을 통한 십전대보탕의 성분 전환으로 인해 십전대보탕의 생리활성이 향상된 것으로 추정된다. HT22 cell에서의 glutamate에 의한 뇌신경세포 사멸의 기전 중 산화적 스트레스에 의한 기전이 보고되었고 항산화 활성의 결과를 통해 발효된 십전대보탕의 ROS 소거능력에 의한 뇌신경세포보호 활성을 나타내는 것으로 판단된다. 추후 발효된 십전대보탕의 뇌신경세포 보호 기전에 대한 연구를 통해 작용 기전 규명에 대한 연구가 진행되어야 한다. 또한 발효에 의한 생물전환 과정에서 전환 또는 생성되는 지표성분에 대한 명확한 성분 규명과 함께 전환 전·후의 생리활성 변화에 대한 연관성에 관한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원 (K09040)에 의하여 수행되었습니다.

#### 참고문헌

- 1) Aruoma, O. I. : Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *JAOCS* **75**, 199 (1998).
- 2) Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. : Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689 (1993).
- 3) Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. :

- Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1 (2006).
- 4) Satoh, T., Enokido, Y., Kubo, T., Yamada, M. and Hatanaka, H. : Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**, 649 (1998).
  - 5) Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A. and Markesberry, W. R. : Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10540 (1991).
  - 6) Fonnum, F. : Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1 (1984).
  - 7) Hara, J., Gerashchenko, D., Wisor, J. P., Sakurai, T., Xie, X. and Kilduff, T. S. : Thyrotropin-releasing hormone increases behavioral arousal through modulation of hypocretin/orexin neurons. *J. Neurosci.* **29**, 3705 (2009).
  - 8) Kim, H.-J., Kim, J.-H., Son, E.-S., Lee, J.-M. and Park, H.-R. : Neuroprotective effect of extracts from root bark of morus alba on glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cells. *J. Life. Sci.* **19**, 963 (2009).
  - 9) Liang, Y. Z., Xie, P. and Chan, K. : Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B.* **812**, 53 (2004).
  - 10) Normile, D. : The New Face of Traditional Chinese Medicine. *Science* **299**, 188 (2003).
  - 11) Heo, J. Y., Kim, B. S. and Kang, J. S. : Study on Antioxidant Action of Sipjeondaebotang. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **17**, 356 (2003).
  - 12) Ryu, J. Y., Yun, J. M., Cho, K. H. and Moon, B. S. : Effects of *Sipjeondaebotang* on oxidative stress of C6 glial cells. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **18**, 1120 (2004).
  - 13) Lee, M.-Y., Ma, J.-Y., Choo, Y.-K. and Jung, K.-Y. : protection of spontaneous and glutamate-induced neuronal damages by Soeumin Sibjeundaibotang and Soyangin Sibimijhwang-tang in cultured mice cerebrocortical cells. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **1**, 55 (2000).
  - 14) Hyon, J.-S., Kang, S.-M., Han, S.-W., Kang, M.-C., Oh, M.-C., Oh, C.-K., Kim, D.-W., Jeon, Y.-J. and Kim, S.-H. : Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus grandis* osbeck peel. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1310 (2009).
  - 15) Park, H. Y., Um, Y. R. and Ma, J. Y. : Quantitative analysis of marker substance in fermented *rehmanniae radix* preparata. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**, 58 (2010).
  - 16) Doh, E.-S., Chang, J.-P., Lee, K.-H. and Seong, N.-S. : Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **18**, 255 (2010).
  - 17) Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, H., Sakai, M. and Hara, Y. : Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free. Radic. Biol. Med.* **21**, 885 (1996).
  - 18) Müller, H. E. : Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **259**, 151 (1995).
  - 19) Satoh, T., Ishige, K. and Sagara, Y. : Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. *Neurosci. Lett.* **371**, 1 (2004).
  - 20) Maher, P. and Davis, J. B. : The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 6394 (1996).
  - 21) Ma, J. Y., Huang, D. S., Lee, N. H., Ha, H. K., Yu, Y. B. and Shin, H. K. : Acute toxicity study on sipjeondaebotang in rats. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* **22**, 1192 (2008).
  - 22) Han, S.-B., Shin, H.-T., Park, H.-M. and Lee, S.-D. : Sibjeondaebotang and Yugmijhwangtang's toxicological effects on pregnant rats. *Kor. J. Oriental Prev. Med. Soc.* **11**, 159 (2007).