

Euryale ferox Salisbury의 항산화효과 및 LDL 산화 억제효과 탐색

김영환 · 이민자¹ · 이혜숙 · 김정국 · 박원환*

동국대학교 한의과대학 진단학교실, 1: 한의학연구소

Screening of Antioxidative Effect and Suppressive Effect of LDL Oxidation of *Euryale ferox* Salisbury

Young-Hwan Kim, Min-Ja Lee¹, Hye-Sook Lee, Jung-guk Kim, Won-Hwan Park*

Department of Diagnostics, 1: Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Topical natural antioxidants are a useful strategy for the prevention of oxidative stress mediated cardiovascular disease including atherosclerosis. From the viewpoint of this underlying principle, the screening of natural plant extracts with scavenging activity for pro-oxidant reactive species is a primary requirement for the development of new topical antioxidant formulations. *Euryale ferox* Salisbury (EF) is botanical name and its pharmaceutical name is EURYALES SEMEN (ES). The stems and branches of EF have been used as a traditional herbal medicine for the treatment of dysentery, diarrhea, leucorrhoea, incontinence and paralysis of joint. In this study, the antioxidant activity of extract from EF was studied *in vitro* methods by measuring the antioxidant activity and free radical scavenging activity by TEAC and DPPH, measuring the scavenging effects on reactive oxygen species (ROS) [superoxide anion, hydroxyl radical] and on reactive nitrogen species (RNS) [nitric oxide and peroxytrite] as well as measuring the inhibitory effect on Cu²⁺-induced human LDL oxidation. The EF extracts were found to have a potent scavenging activity, as well as an inhibitory effect on LDL oxidation. In conclusion, the EF extracts have antioxidative effects *in vitro* system, which can be used for developing pharmaceutical drug against oxidative stress and chronic degenerative disease such as atherosclerosis.

Key words : *Euryale ferox* Salisbury (EF), oxidative stress, antioxidative, ROS & RNS, LDL oxidation

서 론

검인(茨仁, *Euryale ferox* Salisbury)은 생약명이 EURYALES SEMEN으로써 異名으로는 鷄頭實, 雁喙實, 刺蓮蓬實 등으로 불린다. 이 藥은 睡蓮科(수련과; Nymphaeaceae)에 속한 一年生 水生 草本인 가시연꽃 *Euryale ferox* SALISB.의 成熟한 種仁을 乾燥한 것으로, 늦은 가을이나 초겨울에 成熟한 果實을 採取하여 果皮를 除去하고 洗淨한 후 다시 外種皮를 除去하고 曬乾한다. 種字에는 많은 澱粉이 含有되어 있으며, 100 g 중에 함유되어 있는 주요 성분은 단백질 4.4 g, 지방 0.2 g, 탄수화물 32 g, 粗纖維 0.4 g, 灰分 0.5 g, 칼슘 9 mg, 磷 110 mg, 鐵 0.4 mg, vitamin B₁

* 교신저자 : 박원환, 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 진단학교실

· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373

· 접수 : 2010/11/22 · 수정 : 2011/01/20 · 채택 : 2011/02/11

0.40 mg, vitamin B₂ 0.08 mg, vitamin C 6 mg, nicotine 酸 2.5 mg, carotene 微量 등인 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 또한 검인에는 cerebroside 및 tocopherol trimer로서 ferocerebroside A 및 B와 ferotocotrimer C 및 D가 함유되어 있고³⁾, Zhao 등⁴⁾의 보고에 의하면 가시연꽃의 껍질에는 glucosylsterol이 함유되어 있는데 이러한 성분은 24-methy lcholest-5-enyl-3β-O-pyranoglucoside, 24-ethylchoest-5-enyl-3β-O-pyranoglucoside 및 24-ethyl cholesta-5,22E-dienyl-3β-O-pyranoglucoside로 알려져 있다. 效能 및 主治로는 益腎固精, 補裨止瀉, 祛濕止帶, 治夢遺滑精, 遺尿尿頻, 脾虛久瀉, 白濁, 帶下이라고 하였다^{1,2)}.

검인에 대한 국내·외 연구로 이 등⁵⁾은 검인의 각종 추출물에 대한 생리활성을 검토한 결과, 에틸아세테이트 추출물 및 부탄올 추출물이 항산화 효소인 glutathione peroxidase 활성을 증가시킨다고 보고하였다. Puri 등⁶⁾은 면역능에 대한 검인의 효능을 검

또한 결과, 검인이 체액성 면역능을 증가시킨다는 사실을 확인한 바 있다. 또한 Das 등⁷⁾은 검인이 심근의 허혈성 재관류 손상에 있어 보호효과를 나타낸다고 보고하였는데, 검인을 심장세포에 처리하였을 때 심장보호효과를 나타내는 단백질인 thioredoxin-1 (Trx-1)과 thioredoxin-related protein-32 (TRP32)의 함량이 증가한 것으로 관찰되었다. 이처럼 검인의 생리활성에 관한 몇몇 연구가 진행되어 있으나, 다양한 용매별 추출물을 이용한 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 LDL 산화 억제효과에 대한 깊은 연구는 미흡한 실정이다.

‘산화적 스트레스(oxidative stress)’란 세포 내 항산화 방어계(antioxidant defense system)와 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS) 간의 불균형이 초래될 때 생성되는 것으로 수많은 생리/병리학적 현상에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 이러한 ROS 및 RNS는 단백질, 지질, DNA, 당질, 고도불포화지방산과 같은 거대분자를 불활성화 시켜 파괴시키고, 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시키는 염증 반응에 관여 하게 되고 암, 아테롬성경화증, 염증반응, 관절염, 알츠하이머병, 백내장, 당뇨병, 천식, 허혈 등의 만성 퇴행성 질환을 유발하게 된다⁹⁾. 이 중에서 순환기계 질환은 미국과 서유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 사망의 주요인이 되고 있다. 우리나라에서도 식생활이 서구화 되면서 동맥경화, 심근경색, 심장마비 등의 뇌혈관계 질환, 뇌졸중 및 말초혈관계 질환 등 혈액 순환기계 질환이 날로 증가하고 있는 추세이며¹⁰⁾, 특히, 동맥경화 발병 원인에 있어 산화 LDL(oxidized low density lipoprotein)이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고¹²⁾, 그 기전은 다음과 같다. 생체 내·외에서 생성되는 산화적 스트레스는 혈액 내의 LDL을 산화된 LDL로 변화시키게 되고 이 산화된 LDL이 adhesion molecules 을 통해 내막 내로 유입되면 대식세포가 탐색하여 거품세포(foam cell)를 형성하게 되고 염증반응 뿐만 아니라 평활근세포의 분화, 증식 및 내피세포 내막으로의 이주를 촉진하여 이들이 혈관 lumen에 침착되어 지방반(fatty streak)을 형성하고 플라그를 생성함으로써 동맥경화가 유발되게 된다^{13,14)}.

최근 천연물 유래 약용, 기능성 식품 및 의약품 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 항암, 항알러지, 항비만, 항산화 및 항염 등에 효과가 있는 기능성 물질을 분리·정제함으로써 이들을 약으로, 식품첨가제로 또는 화장품의 원료로 개발하려는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다^{15,16)}. 상업적으로 흔히 이용되는 합성 항산화제 경우 그의 변이원성 및 독성이 지적되면서¹⁷⁾ 보다 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이며, 아울러 항산화제에 의해 산화적 스트레스가 차단될 경우 동맥경화와 같은 심혈관질환의 발병 및 진행이 효과적으로 억제된다는 여러 연구결과들이 보고되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

따라서, 본 연구에서는 검인의 항산화효과를 *in vitro*에서 관찰하고 천연항산화제로서의 개발 가능성을 검토하는 한편, LDL 산화 억제효과를 탐색함으로써 산화적 스트레스에 기인한 동맥경화와 같은 심혈관질환의 예방 및 치료에의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Sodium carbonate (Na_2CO_3), potassium chloride (KCl), human low-density lipoprotein (LDL), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS), sodium chloride (NaCl), naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, ethanol (E), hexane (H), dichloromethane (DCM), ethylacetate (EA), butanol (B) 및 methanol (M)은 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), nitro blue tetrazolium (NBT), hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium nitroprusside (SNP), copper (II) sulfate (CuSO_4), trichloroacetic acid (TCA), ferrous sulfate (FeSO_4), gallic acid (GA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), potassium persulfate, ascorbic acid (AA), butylated hydroxytoluene (BHT), potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), hypoxanthine, xanthine oxidase, sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-thiobarbituric acid (TBA) 및 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)는 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)와 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, peroxyinitrite는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 그 외 기타 시약들은 제1급 정품을 이용하였다.

2. 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 검인(芡仁 *Euryale ferox* Salisburi, EF)는 2008년산 중국산 제품을 (주) 음니허브 (경북 영천, 한국)에서 구입한 후 정선수치하여 사용하였다.

1) EF 70% 에탄올 추출물의 제조

시료 100 g에 2 L의 70% 에탄올을 첨가하여 1차 12 시간, 2차 6 시간, 3차 3 시간 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 110 mm-pore-size filter를 통해 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)로 감압 농축한 뒤 동결 건조 하여 동결건조분말 시료 0.86 g을 얻었다(수율: 0.86%).

2) EF 계통분획물의 제조

70% 에탄올로 추출한 EF는 핵산 : 70% 에탄올 추출물 : 물 (10:9:1, v/v/v)로 분획하여 핵산 추출물을 얻은 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 이때의 용매 회분별 수율은 핵산 추출물(H) 0.17%, 디클로로메탄 추출물(DCM) 0.02%, 에틸아세테이트 추출물(EA) 0.16%, 부탄올 추출물(B) 0.16%, 물 추출물(A) 0.14%였다.

3. Total phenolics의 측정

EF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 total

phenolics 함량은 Folin-Ciocalteus reaction²¹⁾에 의해 gallic acid 를 표준품으로 하여 측정하였다. 40 μ L의 EF 추출물 (1 mg/mL) 을 200 μ L의 Folin-Ciocalteus reagent, 1160 μ L의 DW와 혼합하였다. 혼합물은 3 분 간 실온에 방치한 후, 600 μ L의 20% sodium carbonate 를 첨가하였다. 실온에서 2 시간 동안 shaking한 후, microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total phenolics 함량은 gallic acid equivalents (μ g of GA eq/mg)로 나타내었다.

4. TEAC assay에 의한 항산화효과의 측정

EF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 TEAC 값은 Roberta²²⁾와 Miller 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 10 μ L의 EF 추출물 희석용액(1,000 μ g/mL) 또는 Trolox standard에 ABTS \cdot^+ 용액 1.0 mL를 첨가하여 1 분 후 UV/Visible spectrophotometer (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 6 분 간 monitoring하였고 1 mM Trolox와 비교하여 흡광도의 저해 %를 구한 후 mM trolox equivalents로 나타내었다.

5. DPPH assay에 의한 유리기 소거효과의 측정

EF의 유리기 소거효과는 Blois에 의한 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다. 즉, DPPH (a,a'-diphenyl- β -picryl-hydrazyl) 16 mg을 100 mL의 에탄올에 녹인 후 100 mL의 증류수를 혼합하여 여과지로 여과한 후 이 여액 2.5 mL에 일정농도의 EF 추출물 0.5 mL을 혼합한 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 528 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

6. NBT assay에 의한 superoxide anion 소거효과의 측정

EF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 superoxide anion 소거효과는 Gotoh와 Niki의 방법²⁵⁾에 따라 측정하였다. 시험관에 30 mM의 EDTA (pH 7.4), 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 및 1.42 mM nitro blue tetrazolium (NBT)을 각각 100 μ L, 10 μ L, 200 μ L 첨가하여 강하게 교반하였다. 상온에서 3 분 간 반응시킨 혼합물에 0.5 U/mL xanthine oxidase 100 μ L를 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 이를 다시 상온에서 20 분 간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. DCFH-DA assay에 의한 hydroxyl radical 소거효과의 측정

EF의 \cdot OH의 제거능을 측정하기 위하여 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) 분석법²⁶⁾을 이용하였다. 지용성 DCFH-DA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 탈아세틸화 되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 일정 농도의 시료 10 μ L

와 menadione 10 μ L를 넣고 potassium phosphate buffer (pH 7.4) 130 μ L를 넣어 \cdot OH를 생성시킨 후, 125 μ M DCFH-DA에 esterase를 넣어 바꾼 DCFDH를 50 μ L 첨가하여 60 분 간 생성된 형광의 변화를 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

8. DAF-2 assay에 의한 NO radical 소거효과의 측정

EF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 NO radical 소거효과는 DAF-2 assay²⁷⁾를 이용하여 측정하였다. 특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여 490-495 nm의 파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. DAF-2가 1 mg이 녹아있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1 : 400배로 희석하였다. NO 제공물질인 SNP와 DAF-2를 96 well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10 분 후 excitation wave length 485 nm 및 emission wave length 530 nm에서 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

9. DHR 123 assay에 의한 peroxynitrite 소거효과의 측정

EF 70% 에탄올 추출물 및 용매별 계통분획물의 peroxynitrite 소거효과는 Crow의 방법²⁸⁾에 따라 측정하였다. 즉, 96-well microplate에 EF를 농도별로 취하고 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123를 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. 이에 10 μ M ONOO \cdot 를 첨가한 후 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 500 nm, emission 536 nm에서 측정하였다. ONOO \cdot 생성원으로는 시판되는 peroxynitrite를 직접 사용하여 생성되는 superoxide anion과 nitric oxide의 반응으로 발생하는 ONOO \cdot 의 제거 활성능을 검토하였다.

10. Human LDL 산화 억제효과의 측정

EF 추출물의 human LDL 산화 억제효과는 Yagi의 방법²⁹⁾에 의해 측정하였다. 즉, human LDL 0.5 mL에 10 mM PBS buffer (pH 7.4)를 1.5 mL, 0.1 mM CuSO₄ 40 μ L 및 용매 또는 시료 40 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 간 배양하였다. 여기에 20% TCA를 1.5 mL, 0.05 M NaOH에 녹인 0.67% TBA를 1.5 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90 $^{\circ}$ C, 45 분 간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2,000 \times g에서 5 분 간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 기포를 제거한 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율을 구한 후 IC₅₀ 값으로 환산하였다.

11. 통계처리

통계 분석은 SPSS version 18.0 for Windows (SPSS, Chicago,

IL, USA) program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $p < 0.05$ 에서 유의한 차이가 있는 경우 Tukey test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. Yield of fraction and total phenolics

EF 추출물 및 계통분획물의 수율은 E층에서 0.86 g/100 g EF 였으며, 용매별 분획물의 경우 0.02 g/100 g EF (DCM 분획물)에서 0.17 g/100 g EF (H 분획물)의 범위로 나타났다(Table 1). Folin-Ciocalteu reagent method에 의해 측정된 total phenolics 함량은 8.79 $\mu\text{g GA eq/mg}$ (A 분획물)에서 175.78 $\mu\text{g GA eq/mg}$ (DCM 분획물)의 범위였고, 다음 순서와 같이 높은 것으로 나타났다: DCM > EA > E > H > B > A 분획물(Table 1).

본 연구에서는 다양한 극성을 지닌 용매를 이용해 EF를 추출하였고, 각 용매별로 비극성 항산화 분획물부터 중간정도 및 높은 극성을 가진 항산화 분획물까지 분리하였다. 이 경우에 H는 E에 비해 극성이 다소 낮은 항산화 물질을 추출해 낸다. 추출과정 동안 몇몇 파라미터들이 총 페놀 함량에 영향을 미치기도 하는데 추출 온도, 용매 타입 및 용매 농도 같은 것들이 이에 포함된다.

페놀화합물(페놀 또는 폴리페놀)은 식물에 편재하는 이차적 식물성 대사산물로서 그들은 항산화효과를 비롯한 다양한 생물학적 효능을 지니는 것으로 보고되고 있다. 페놀화합물은 높은 수준의 항산화효과를 보여주므로 여러 천연물의 항산화효과를 평가하기 위해 총 페놀 함량을 측정하는 것은 의미가 있다³⁰⁾. 더구나 일련의 연구들^{31,32)}은 몇몇 식물들에 존재하는 총 페놀 함량과 항산화효과 사이에는 유의적인 상관관계가 있음을 보고하였고, 이는 페놀 함량이 높은 식물의 경우 항산화제의 좋은 자원이 될 수 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서 총 페놀함량 결과를 통해 EF는 산화적 스트레스로부터 보호작용을 갖는 예방의학적 페놀물질의 근원으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Extraction yields and contents of total phenolics in the extracts of EF

Sample ¹⁾	Yield (%) ²⁾	Total phenolics ($\mu\text{g GA eq/mg}$) ³⁾
E	0.86	70.18 \pm 0.02 ^b
H	0.17	47.34 \pm 0.04 ^c
DCM	0.02	175.78 \pm 2.52 ^d
EA	0.16	171.38 \pm 1.69 ^a
B	0.16	39.18 \pm 0.13 ^d
A	0.14	8.79 \pm 0.01 ^e

¹⁾E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. ²⁾Extraction yield is expressed as the percentage dry weight of EF. ³⁾Values are mean \pm SD (n=3). ^{a-e)}Values with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey test.

2. TEAC에 의한 항산화효과 및 DPPH에 의한 유리기 소거효과

TEAC assay에 의해 측정된 EF의 항산화활성은 Table 2에서

볼 수 있다. 조추출물인 E층은 0.131 mM Trolox equivalent의 값을 나타내었고, 용매별 분획물은 일반적으로 0.010~0.166 mmol Trolox equivalents 범위의 항산화활성을 보여, 각각 분획물에 따라 항산화활성의 차이가 큰 것으로 관찰되었다. EF의 EA 분획물(0.166 mM Trolox equivalent)은 가장 큰 항산화활성을 나타내었으며 DCM 분획물(0.097 mM Trolox equivalent) 및 H 분획물(0.096 mM Trolox equivalent)의 순서로 항산화활성이 감소되었다. 또한 A 분획물은 항산화활성이 관찰되지 않았으며 대조군으로 이용된 AA와 BHT는 항산화활성이 각각 0.223, 0.822 mM Trolox equivalent로 EF의 EA층 보다 유의적으로 우수한 항산화효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 EF 추출물에서 페놀 화합물의 함량이 높았던 DCM층 및 EA층에서 높은 항산화효과를 가지는 것으로 나타나, EF에 함유된 페놀 화합물에 의해 TEAC 값이 증가된 것으로 사료되었다.

TEAC assay는 특정 조건에서 뛰어난 재현성을 지니며, 다양한 항산화제들 간의 차이를 유의적으로 나타낼 수 있을 정도의 민감도를 가진다. 이 방법에서 ABTS \cdot^+ 는 효소, 화학적 반응에 의해 생성되어 친수성, 또는 유기 용매에 용해되어 흡광도를 측정하게 되므로 수용성, 지용성 화합물에 관계없이 항산화 활성을 측정할 수 있다는 장점을 가진다. ABTS \cdot^+ 라디칼은 DPPH 라디칼에 비해 더 반응성이 높으며 이것은 DPPH 라디칼과는 다르게 반응한다. ABTS \cdot^+ 라디칼과의 반응은 전자-전이 과정을 포함하며 분광광학적 방법을 기초로 하고 있다. 수용성 비타민 E analogue인 Trolox와 항산화제의 ABTS \cdot^+ 소거활성을 비교함으로써 TEAC 값이 측정되며 ABTS는 650, 734, 820 nm에서 특징적인 흡수 스펙트럼을 가지는데 ABTS \cdot^+ 은 potassium persulfate와 ABTS의 산화에 의해 생성되어지고, blue/green color를 가진다²²⁾. 이 방법은 *in vivo*에서의 총항산화능 측정 뿐만 아니라 *in vitro*에서도 항산화능을 측정하기 위해 널리 이용되고 있는데, 734 nm의 긴 최대 흡광도 파장을 가져 때때로 식물성 추출물에서 나타나는 색깔에 의한 간섭을 최소화할 수 있기 때문에 식물의 항산화효과를 평가하기 위해 유용한 것으로 보고되고 있다³³⁾.

DPPH를 이용하여 EF의 유리기 소거효과를 측정된 결과도 Table 2에 나타나 있다. 일반적으로 DPPH 소거효과는 IC₅₀값으로 나타내는데, 이는 시험용액에서 50%의 DPPH를 소거하는데 필요한 항산화제의 농도로 표현된다. 따라서 결과는 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 EF 추출물의 농도로 나타내었으며 낮은 IC₅₀ 값을 나타낼수록 DPPH radical을 소거하는 효과는 크다³⁴⁾. 조추출물인 E 추출물의 경우 IC₅₀값이 446.04 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타났으며, EA 분획물의 유리기 소거효과는 IC₅₀값이 173.35 $\mu\text{g/mL}$ 으로써 일등히 우수한 소거효과를 보였다. 또한 다른 용매별 분획물에서는 유리기 소거효과가 다음과 같은 순서로 감소되었다; DCM 분획물 (IC₅₀=477.70 $\mu\text{g/mL}$) > H 분획물 (IC₅₀=987.36 $\mu\text{g/mL}$) > B 분획물 (IC₅₀=1,375.32 $\mu\text{g/mL}$) > A 분획물 (IC₅₀=3,018.21 $\mu\text{g/mL}$). 한편, 대조군으로 사용된 AA 및 BHT는 각각 IC₅₀값이 148.66 $\mu\text{g/mL}$, 193.88 $\mu\text{g/mL}$ 로 관찰되어 EA 분획물이 대조군과 유사한 항산화효과를 나타냄을 알 수 있었고 다른 분획물들도 이들 보다는 낮은 항산화활성을 보였으나 단일

물질이 아닌 조추출물이라는 점에서 비교적 높은 항산화활성을 가지는 것으로 사료되었다.

세포가 성장하고 자라면서 발생하는 free radical에 의해 세포가 산화되어 손상되는데 페놀성 화합물은 환원성이 강해서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화능이 있다고 알려져 있다. DPPH는 자체가 안정한 free radical을 지니고 있는 화합물로 항산화물질에 의해 환원되므로 항산화능을 확인하는데 널리 사용되는 물질이다. 위와 같은 결과로 EF에서도 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력이 있음이 확인되었으며 이는 EF의 페놀성 화합물에 의한 작용으로 판단된다.

Table 2. Antioxidant activities and free radical scavenging activities of the extracts of EF as determined by the ABTS^{•+} assay and DPPH assay

Sample ¹⁾	TEAC ²⁾ (mM Trolox equivalent)	Free radical scavenging activities ³⁾ (IC ₅₀ =μg/mL)
E	0.131±0.003 ^d	446.04±23.64 ^d
H	0.096±0.005 ^e	987.36±37.25 ^c
DCM	0.097±0.011 ^e	477.70±97.90 ^d
EA	0.166±0.017 ^c	173.35± 25.90 ^{ef}
B	0.010±0.002 ^f	1,375.32±175.90 ^b
A	NA	3,018.21±110.81 ^a
AA	0.223±0.013 ^b	148.66± 5.91 ^f
BHT	0.822±0.021 ^a	193.88± 7.74 ^e

¹⁾E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. ^{2,3)}Values are mean±SD (n=3). ^{a-f)}Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test. ⁴⁾NA is not active.

3. ROS (superoxide anion 및 hydroxyl radical) 소거효과

EF의 superoxide anion 소거활성을 측정한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 조추출물인 E층의 IC₅₀값이 173.26 μg/mL 이었고, EA 분획물의 IC₅₀값은 638.12 μg/mL으로써 superoxide anion을 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다. DCM 분획물과 B 분획물은 비교적 낮은 superoxide anion 소거활성을 보였으며 H 분획물은 활성이 없는 것으로 관찰되었다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA의 경우는 IC₅₀값이 1,041.18 μg/mL로 superoxide anion 소거활성이 EF E 추출물이나 EA 분획물 보다 낮았고, BHT의 경우는 superoxide anion 소거효과가 없는 것으로 나타났다.

Superoxide anion은 선택적 반응성을 지닌 산소가 중심에 위치해 있는 라디칼이다. 비교적 약한 산화제이고 제한된 화학적 반응성을 나타내에도 불구하고, 수많은 효소계에 의해 singlet oxygen, hydroxyl radical과 같은 더 위험한 활성산소종을 생성시켜 지질의 과산화를 초래한다. Superoxide anion은 생물학적 거대분자와 반응할 수 있는 유리기를 활성화시킴으로써 조직손상을 야기할 수 있고, 직접적으로 지질과산화를 개시하기도 한다³⁵⁾. Superoxide anion은 처음에는 정상적으로 생성되지만, 그들의 효과는 다른 종류의 유리기와 산화제를 생성함으로써 확대된다. 본 연구에서는 EF 추출물의 superoxide anion 소거효과를 측정하기 위해 NBT 환원법을 이용하였다. 이 방법에서 xanthine oxidase에 hypoxanthine을 첨가하면 superoxide anion이 생성되게 되고 이는 노란색의 NBT를 환원시켜 청색의 diformazan으로 변화시킴으로써 560 nm에서 흡광도가 증가되게 된다. 이때,

superoxide anion 소거활성을 갖는 물질을 첨가하면, NBT의 환원을 감소시켜 diformazan의 생성 역시 감소하게 된다.

EF의 hydroxyl radical 소거효과를 측정한 결과, Table 3에 보여 지는 바와 같이 조추출물인 E층의 IC₅₀값은 545.12 μg/mL 이었고, 계통분획물 중 DCM 분획물의 IC₅₀값이 149.98 μg/mL으로써 hydroxyl radical 소거활성이 가장 높게 나타났으며, EA 분획물(IC₅₀=163.10 μg/mL)에서도 비교적 높은 소거활성을 나타내었다. 한편, B 및 A 분획물에서는 hydroxyl radical 소거효과가 관찰되지 않았다. 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC₅₀값이 61.79 μg/mL로 hydroxyl radical 소거활성이 EF에 비해 유의적으로 높았다. 따라서, EF는 강력한 항산화제로 알려져 있는 AA 보다는 낮지만 hydroxyl radical을 효과적으로 소거하여 microsomes의 지질과산화를 억제시킬 것으로 사료된다.

Table 3. ROS (superoxide anion and hydroxyl radical) scavenging activities of the extracts of EF

Sample ¹⁾	ROS (IC ₅₀ =μg/mL)	
	Superoxide anion ²⁾	Hydroxyl radical ³⁾
E	173.26± 11.32 ^f	545.12±18.32 ²⁾
H	NA ⁴⁾	749.93±24.16 ³⁾
DCM	2,215.20± 26.96 ^c	149.98±11.74 ^c
EA	638.12± 13.58 ^e	163.10±15.95 ^c
B	4,166.79±134.54 ^b	NA
A	9,265.68±169.82 ^a	NA
AA	1,041.18±113.26 ^d	61.79±5.88 ^d
BHT	NA	NA

¹⁾E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. ^{2,3)}Values are mean±SD (n=3). ^{a-f)}Values with different superscripts in the same column are significantly different at p< 0.05 by Tukey test. ⁴⁾NA is not active.

4. RNS (NO radical 및 peroxynitrite) 소거효과

EF 추출물의 nitric oxide 소거활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 조추출물인 E층의 IC₅₀값은 29.07 μg/mL 이었고, 계통분획물 중에서는 EA 분획물의 IC₅₀값이 17.38 μg/mL으로써 nitric oxide 소거활성이 가장 높게 나타났으며 다음과 같은 순서로 나타났다; DCM 분획물(IC₅₀=29.44 μg/mL)> H 분획물(IC₅₀=156.18 μg/mL)> B 분획물(IC₅₀=203.46 μg/mL)> A 분획물(IC₅₀=444.51 μg/mL). 대조군으로 쓰인 AA의 경우 IC₅₀값이 8.34 μg/mL로 나타난 반면, BHT는 NO 소거 활성이 관찰되지 않아 EF는 AA 보다는 미약하나 BHT 보다는 NO radical을 효과적으로 소거하는 것으로 나타났다. Nitric oxide (NO) radical은 무기저분자 라디칼로서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS는 정상적인 상황에서 생리적인 역할을 담당하는 constitutive NOS (cNOS)와 병리적인 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)의 두 가지 형태로 크게 분류된다. 그리고 cNOS는 다시 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)로 나누어진다. nNOS와 eNOS는 지속적으로 발현되며 Ca²⁺과 calmodulin 의존성으로 적은 양의 NO를 생성한다. nNOS는 주로 신경계에 존재하고 중추신경계에서 신경전달 기능을 담당하는 NO를 생성한다. eNOS는 혈관내피세포에 주로 분포하며 혈관의 수축과 이완에 영향을 미쳐 혈압을 조절하는 기능을 담당하는 NO를 생성한다. 반면에 iNOS는 Ca²⁺

과 calmodulin 의존성이 없으며, 혈관내피세포나 근육세포를 포함한 다양한 조직에서 발견되며 대식세포나 신경교세포에서 LPS, interferon-gamma (IFN-γ), Alzheimer's amyloid peptide 등의 면역학적인 자극에 의해 유도된다. iNOS는 원충, 세균이나 암세포를 사멸시키기 위한 숙주의 방어기전으로 다량의 NO를 만들어내지만 정상 농도의 수천 배에 달하는 NO는 오히려 자가면역질환이나 만성염증의 원인이 되기도 한다³⁶). 과량의 NO는 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandins (PGs) 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시키는 것으로 보고되었다³⁷).

본 실험에서 peroxynitrite 소거능 실험으로 EF 추출물이 RNS의 생성을 효과적으로 방지 할 수 있는지를 살펴보고자 EF의 ONOO⁻ 소거활성을 DHR 123을 이용하여 측정하였다. 그 결과 조추출물인 E층의 IC₅₀값이 62.12 µg/mL로 나타났으며 분획물 중에서는 EA 분획물의 IC₅₀값이 3.87 µg/mL으로써 탁월한 peroxynitrite 소거활성을 보였다. 또한 DCM 분획물(IC₅₀=9.92 µg/mL), B 분획물(IC₅₀=37.87 µg/mL) 및 H 분획물(IC₅₀=140.25 µg/mL) 등으로 항산화활성이 높게 나타났다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA 및 BHT의 경우 IC₅₀값이 각각 3.20 µg/mL, 118.87 µg/mL로, EF EA 분획물은 AA 보다 다소 낮았으나, 매우 높은 peroxynitrite 소거활성을 나타내어 EF의 EA층이 효과적인 peroxynitrite 소거제로 작용함을 알 수 있었다(Table 4).

ONOO⁻는 superoxide anion과 nitric oxide의 제한된 반응에 의해 생성되는 강력한 생물학적 산화제로 유리형 L-tyrosine 또는 단백질 내 tyrosine 잔기의 nitration을 유도하여 정상적 단백질 형태에 영향을 미치게 된다. Peroxynitrite의 생성비율은 superoxide anion 및 nitric oxide의 농도에 의존되는데 비록 작은 양의 기질 증가에 의해서도 peroxynitrite 생성량은 현저하게 증가되어 세포독성을 나타내게 된다. 또한, peroxynitrite는 자극을 받은 대식세포, 호중구, 내피세포에서 생성되며 동맥경화성 심장질환, 급성 폐렴, 만성 염증 시 *in vivo*에서도 생성된다. 이는 *in vitro*와 *in vivo*에서 강력한 산화제로 작용하며 단백질, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기할 뿐만 아니라 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다^{36,38}). 이와 같이 NO는 NO 자체로서 보다는 peroxynitrite의 형태로 다양한 산화적 손상을 유발한다. NO의 생성단계는 iNOS의 발현 또는 효소활성을 저해함으로써 조절가능하며, 일단 생성된 NO는 peroxynitrite의 형태로 조직 손상을 일으키므로, NO에 의한 다양한 질환을 예방 또는 치료하기 위해서는 peroxynitrite를 소거할 수 있는 물질이 유용하다.

5. Human LDL 산화 억제효과

CuSO₄ 유도-LDL 산화 억제효과에 대한 EF 추출물의 효과를 검토한 결과 Table 5에 나타난 바와 같이 조추출물인 E층의 경우 IC₅₀값이 90.47 µg/mL 이었고, EA 분획물의 IC₅₀값이 41.94 µg/mL으로써 계통 분획물 중 가장 효과가 큰 것으로 나타났다. 한편, 대조군으로 쓰인 AA 및 BHT의 경우 IC₅₀값이 각각 6.18,

2.63 µg/mL로 대조군 보다는 낮았으나 비교적 우수한 LDL 산화 억제효과를 나타내었다.

혈액 내 LDL 수준의 증가가 동맥경화의 제 1의 위험인자이며, LDL이 산화되어 foam cell로 전환될 때 혈관 내 플라그 형성을 가속화시키는 것으로 알려져 있다³⁹). 따라서, LDL 자체의 상승을 억제하는 것도 중요하지만 혈중에서 산화되는 것을 억제하는 것 또한 동맥경화의 예방에 있어 중요하다. LDL 산화 억제효과가 있는 항산화물질로는 tocopherol, carotenoids, ascorbic acid, isoflavone과 flavonoid들로 이들의 효과는 이미 *in vitro* 및 *ex vivo*에서 관찰된 바 있다⁴⁰).

이로써 본 실험에 이용한 EF의 강력한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 동맥경화와 같은 세포의존성 염증관련 질환의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사한다.

Table 4. RNS (nitric oxide and peroxynitrite) scavenging activities of the extracts of EF

Sample ¹⁾	RNS (IC ₅₀ =µg/mL)	
	Nitric oxide radical ²⁾	Peroxynitrite ³⁾
E	29.07±0.82 ^d	62.12±1.53 ^c
H	156.18±3.64 ^c	140.25±2.72 ^a
DCM	29.44±1.02 ^d	9.92±0.59 ^g
EA	17.38±0.69 ^e	3.87±0.06 ^f
B	203.46±5.05 ^b	37.87±3.83 ^d
A	444.51±7.14 ^a	NA ⁴⁾
AA	8.34±0.06 ^f	3.20±0.08 ^g
BHT	NA ⁴⁾	118.87±2.95 ^b

¹⁾E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. ^{2,3)}Values are mean±SD (n=3). ^{a-g)}Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test. ⁴⁾NA is not active.

Table 5. Inhibitory effect on Cu²⁺-induced LDL oxidation of the extract of EF

Sample ¹⁾	Inhibitory effect on Cu ²⁺ -induced LDL oxidation ²⁾ (IC ₅₀ =µg/mL)
E	90.47±5.46 ^a
H	80.51±3.24 ^b
DCM	60.88±1.56 ^c
EA	41.94±1.97 ^d
B	65.36±2.31 ^c
A	NA ³⁾
AA	6.18±0.58 ^e
BHT	2.63±0.09 ^f

¹⁾E, 70% ethanol extract; H, hexane fraction; DCM, dichloromethane fraction; EA, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; A, aqueous fraction. ²⁾Values are mean±SD (n=3). ^{a-f)}Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Tukey test. ³⁾NA is not active.

결 론

EF를 70% 에탄올로 추출하고 이를 용매 극성별로 계통 분획하여 *in vitro* 상에서의 항산화효과를 TEAC법에 의한 항산화효과, DPPH를 이용한 유리기 소거효과, ROS (superoxide anion, hydroxyl radical) 소거효과 및 RNS (NO radical, peroxynitrite) 소거효과에 의해 알아본 결과, EA 추출물에서 항산화효과가 높게 나타났다. 또한 human LDL에 대한 EF 추출물의 산화 억제효과

과를 검토한 결과 대조군으로 사용된 AA 보다 우수한 효과를 보여 EF의 우수한 항산화활성이 산화 LDL 내의 지질 과산화물의 축적에 의해 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 산화적 스트레스에 의한 동맥경화질환의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용될 수 있음을 시사하였다.

이상의 실험결과로부터 본 실험에 사용된 EF는 산화적 스트레스에 의해 유발되는 만성퇴행성질환 및 동맥경화와 같은 심혈관질환을 항산화 기작을 통해 예방 및 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 共編, 「本草學」, 서울, 永林社, pp 233-234, 1991.
2. 鄭普燮 辛民教共編, 「鄉藥(生藥)大辭典」, 서울, 圖書出版 永林社, pp 938-940, 1990.
3. Row, L.C., Ho, J.C., Chen, C.M. Cerebrosides and tocopherol trimers from the seeds of *Euryale ferox*. *J Nat Prod.* 70: 1214-1217, 2007.
4. Zhao, H.R., Zhao, S.X., Sun, C.Q., Guillaume, D. Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and mass spectrometry. *J Lipid Res.* 30: 1633-1637, 1989.
5. Lee, S.E., Ju, E.M., Kim, J.H. Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed. *Exp Mol Med.* 34: 100-106, 2002.
6. Puri, A., Sahai, R., Singh, K.L., Saxena, K.C. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *J Ethnopharmacol.* 71: 89-92, 2000.
7. Das, S., Der, P., Raychaudhuri, U., Maulik, N., Das, D.K. The effect of *Euryale ferox* (Makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 289(1-2):55-63, 2006.
8. Aruoma, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 75: 199-212, 1998.
9. Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-247, 2000.
10. Frank, M.S., Martijn, K. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoprotein and cardiovascular disease. *Am J Med.* 113: 13-24, 2002.
11. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874, 2002.
12. Berliner, J.A., Heinecke, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 20: 707-727, 1996.
13. Meagher, E., Rader, D.J. Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies. *Trends Cardiovasc Med.* 11: 162-165, 2001.
14. Yokoyama, M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Cur Opin Pharmacol.* 4: 110-115, 2004.
15. Kim, H.J., Ahn, M.S., Kim, G.H., Kang, M.H. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Korean J Food Sci Technol.* 38: 799-804, 2006.
16. Ali, K.A., Abdelhak, M., George, B., Panagiotis, K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chem.* 89: 27-36, 2005.
17. Barene, A.L. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc.* 52: 59-63, 1975.
18. Farbstein, D., Kozak-Blickstein, A., Levy, A.P. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules* 15(11):8098-8110, 2010.
19. Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., De Caterina, R. Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovasc Ther.* 28(4):e13-e19, 2010.
20. de Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci.* 11(4):1679-703, 2010.
21. Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effects of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agri Food Chem.* 48: 5338-5342, 2000.
22. Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26: 1231-1237, 1999.
23. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A.A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 84: 407-412, 1993.
24. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200, 1958.
25. Gotoh, N., Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochem Biophys Acta* 1115: 201-207, 1992.
26. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* 186: 1-85, 1990.
27. Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of

- catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem. (Tokyo)* 125: 658-661, 1999.
28. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157, 1997.
 29. Yagi, K.A. Simple fluometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 15: 212-216, 1976.
 30. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20: 933-956, 1996.
 31. Kaur, C., Kapoor, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol.* 37: 153-161, 2002.
 32. Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* 100(4):1409-1418, 2007.
 33. Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X.L., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J Agric Food Chem.* 51: 6657-6662, 2003.
 34. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Tech.* 26: 211-219, 2004.
 35. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-4, 1984.
 36. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley-Usmar, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411: 385-400, 1999.
 37. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G., Needleman, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 7240-7244, 1993.
 38. Channon, K.M., Qian, H., George, S.E. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1873-1881, 2000.
 39. Witzum, J.L. The role of monocytes and oxidized LDL in atherosclerosis. In: *Atherosclerosis Reviews*. Leaf A. Weber PC. (eds). Raven Press, New York, USA. 21: 59-69, 1990.
 40. Raya, A.A., Raya, S.A. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 5: 331-337, 2006.