pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 3, pp. 210~215 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.3.210

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

산지별 고려엉겅퀴의 Pectolinarin 함량 및 항산화 활성

조봉연[1] · 이진하[1] · 라문진[2] · 김선영[2] · 강일준[3] · 한경찬[4] · 이옥환[1]*
[1]강원대학교 식품생명공학과, [2]홍천메디칼허브연구소, [3]한림대학교 식품영양학과, [4](주)하티

Analysis of Pectolinarin Content and Antioxidant activity in *Cirsium setidens* Nakai by Cultivars

Bong-Yeon Cho[1], Jin-Ha Lee[1], Moon-Jin Ra[2], Sun-Young Kim[2], Il-Jun Kang[3], Kyoung-Chan Han[4] and Ok-Hwan Lee[1]*
[1]*Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea*
[2]*Hongcheon Institute of Medicinal Herb, Hongcheon 25142, Korea*
[3]*Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 24252, Korea*
[4]*HATTI Co., Ltd., Hongcheon 25142, Korea*
(Received March 30, 2016/Revised April 5, 2016/Accepted April 12, 2016)

ABSTRACT - This study was performed to provide basic data of *Cirsium setidens* Nakai by cultivars that will be applied for development of functional foods and ingredients. We assessed pectiolinarin content, total flavonoids content and antioxidant effects (DPPH radical scavenging activity and ORAC assay) of *C. setidens* Nakai. Our results showed that the pectolinarin and total flavonoids contents of *C. setidens* Nakai by cultivars ranged from 3.95 ± 0.05 to 7.29 ± 0.07 mg/g and from 40.42 ± 0.91 to 76.70 ± 2.24 mg pectolinarin equivalent (PNE)/g, respectively. Among *C. setidens* Nakai by cultivars, the pectolinarin content was highest in GW-D extract. Futhermore, the DPPH radical scavenging activity of *C. setidens* Nakai ranged from 31.25 to 81.93%, respectively. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value was highest in GW-D and GW-E extracts (514.49 and 501.73 μM TE/g, respectively). These results suggest that *C. setidens* Nakai extract could be considered as a good sources of natural antioxidants and functional food ingredients.

Key words : *C. setidens* Nakai, pectolinarin, antioxidant activity, total flavonoid content

엉겅퀴(*Cirsium japonicum var.* ussuriense)는 국화과(Asteraceae)에 속하는 이년생 또는 다년생의 초본으로 한국, 중국, 일본 등 북반구 온대지역에서 주로 자생하며, 우리나라에서는 '가시나물', '항가새'라고도 하며 한방에서는 엉겅퀴 뿌리는 '대계근'이라고 부른다. 엉겅퀴 잎에는 톱니와 더불어 가시가 있으나, 봄에 비교적 가시가 연한 어린잎과 부드러운 줄기는 살짝 데쳐서 나물이나 국으로 이용한다[1]. 국내에 자생하는 엉겅퀴들 중에서 *Cirsium*속에 속하는 것들로는 *Cirsium pendulum*(큰엉겅퀴), *C. setidens*(고려엉겅퀴), *C. rhinoceros*(바늘엉겅퀴), *C. schantarense*(도깨비엉겅퀴), *C. lineare*(버들잎엉겅퀴), *C. vlassovianum*(흰잎엉겅퀴), *C. nipponicum*(물엉겅퀴) 등 8종이다[2]. 엉겅퀴 중에서 *C. setidens* Nakai(고려엉겅퀴)는 민간에서 곤드레라고 불리기도 하며 폴리페놀 성분을 비롯한 식이섬유, 무기질 및 비타민 등이 함유되어 있어 항암활성을 비롯한 다양한 생리활성이 보고된 바 있다[3-5]. 한방에서는 지상부 또는 지하부를 약용으로 이용해 왔으며, 지상부는 봄철에 뿌리는 가을철에 채취하여 경혈, 지혈, 소종의 효능으로 토혈, 혈뇨, 대하, 간염 및 고혈압 등의 치료에 사용한다고 보고되었다[6-8].

고려엉겅퀴는 생리활성 측면에서 우수함에도 불구하고 한정된 식품류(비빔밥, 묵나물 등)의 원료로만 사용되고 있어 부가가치가 높은 식품소재로의 활용성이 필요한 실정이다. 고려엉겅퀴는 수천 년 동안 식품원료로 사용되어 안전성이 확보된 식품원료로 최근 연구에서도 고려엉겅퀴의 간보호 효과[9], 면역기능 증진[10] 및 항염증 활성[11]등에 대해 보고되어 건강기능식품의 원료로 활용 가능성이 높은 소재이다.

건강기능식품을 개발하기 위해서는 천연물질의 기능성

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5565
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

과 안전성을 과학적으로 입증해야하며 원료에 대한 표준화가 필요하다[12]. 표준화란 천연물질이 함유하고 있는 고유한 성분의 변동을 최소화하여 일정한 품질이 유지될 수 있도록 원재료의 생산에서부터 제조 과정 전반에 걸쳐 사용된 기술과 정보를 관리하는 것을 말하며, 원재료에 함유된 지표성분의 변화를 분석하여 표준화된 건강기능식품 소재를 생산할 수 있다. 지표성분은 기능성 원료의 기능성이 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있으므로 공인된 방법 혹은 정밀한 분석방법을 사용하여야하며, 지표성분에 대한 기준 규격을 설정하기 위해 분석방법의 과학적 타당성과 신뢰성이 검증되어져야 한다[13]. 표준화를 위한 과학적인 접근방법으로 원료에 대한 산지별/수확시기별 지표성분 함량 분석, 지표성분의 분석법 개발 및 검증(validation), 생산 단계별 및 공정별 지표성분의 함량 분석 등 건강기능식품 원료의 표준화와 규격화는 매우 중요하다.

따라서 본 연구에서는 고려엉겅퀴를 건강기능식품 소재로 활용 시 표준화를 위한 기초자료 제공하고자 고려엉겅퀴의 주요 산지별 pectolinarin 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거능, ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay 등을 분석하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai) 시료는 국내에서 생산된 것으로 산지별로 총 7곳 농장[강원도 인제군, 홍천군, 정선군, 태백시, 평창군(GW-AE), 전라남도 고흥군(JN-A), 제주시(JJ-A)]에서 각각 구입하여 사용하였다. 시료는 food mixer를 이용하여 조분쇄 한 후, 20 mesh를 분말화하여 실험에 사용하였다. 고려엉겅퀴의 지표성분인 pectolinarin 표준물질(purity ≥ 98.0%)은 Carbosynth (Compton, Berkshire, UK)에서 구입하였으며 pectolinarin의 비배당체(aglycone)인 pectolinarigenin은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, Sichuan, China)에서 구입하였다. HPLC 용매로 사용한 acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서, trifluoroacetic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 산지별 고려엉겅퀴의 항산화활성 분석에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, fluorescein (sodium salt)은 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

Pectolinarin 분석

고려엉겅퀴에 함유된 pectolinarin 및 pectolinarigenin의 분석을 위한 시료의 전처리는 Jung 등[14]의 방법을 변형하여 제조하였다. 고려엉겅퀴 시료 625 mg에 80% 에탄올 50 mL을 첨가하고 30분간 Sonicator (JAC Ultrasonic, KODO, Hwaseong, Korea) 처리한 후 원심분리기(3,000 rpm, 10분)를 사용하여 상층액을 분리하고 여과하여 사용하였다. Pectolinarin과 pectolinarigenin의 HPLC 분석은 Kim 등[12]의 방법을 변형하여 실시하였으며 서로 다른 두 개의 표준물질을 동시분석 하였다. 분석에 사용한 기기는 Labogene iLC3300 HPLC system (Labogene, Eresing, Germany)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Sunfire™ C18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

Table 1. HPLC conditions of pectolinarin and pectolinarigenin analysis for *C. setidens* Nakai by cultivars

Instrument	Conditions		
Column	Sunfire™ C18, 5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm		
Detector	i3250 UV/VIS Detector 340 nm		
Column temp.	40°C		
Mobile phase (Gradient)	Time	0.05% TFA[1)] in water	0.05% TFA in acetonitrile
	(min)	(%)	(%)
	0	70	30
	6	70	30
	11	53	47
	22	53	47
	25	70	30
	30	70	30
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	30 min		

[1)]TFA: trifluoroacetic acid

총 플라보노이드 함량 분석

총 플라노이드 함량은 Kim 등[15]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL을 첨가한 후 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL와 증류수 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 30분간 방치하였다. 다음 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 pectolinarin을 이용하였으며 표준 검량 곡선($y = 0.294x - 0.0017$ $R^2 = 0.9998$)으로부터 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능은 Ozgen 등[16]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 ethanol로 용해한 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 10분간 반응

하였다. 그리고 microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정한 후 시료의 DPPH radical 소거능은 다음 식에 의해 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left\{1 - \left[\frac{A_{Experiment}}{A_{control}}\right]\right\} \times 100$$

ORAC 지수 측정

ORAC 지수 측정은 Huang 등[17]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료의 농도별 희석은 75 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하였다. Black well plate에 시료 25 μL, 40 nM fluorescein 150 μL을 첨가하고 측정 직전에 150 mM AAPH 25 μL을 첨가한 다음 fluorescence microplate reader (Spectramax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 485 nm에서 전자여기 후 530 nm에서 방출되는 조건으로 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 결과 값은 시료 첨가구와 무 첨가구의 area under curve (AUC) 값을 나타낸 후, 표준물질인 Trolox를 이용하여 표준 검량 곡선(y = 1.6735x + 0.6165, R2 = 0.9967)에 대입하여 나타내었다.

Area under curve (AUC) = 1 + f1/f0 + f2/f0 + f3/f0 + 4/f0 + ...f/31/f0

통계처리

Pectolinarin 함량, 총 플라보노이드 함량, 항산화 활성 결과값의 통계처리는 SAS version 9.3 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 P <

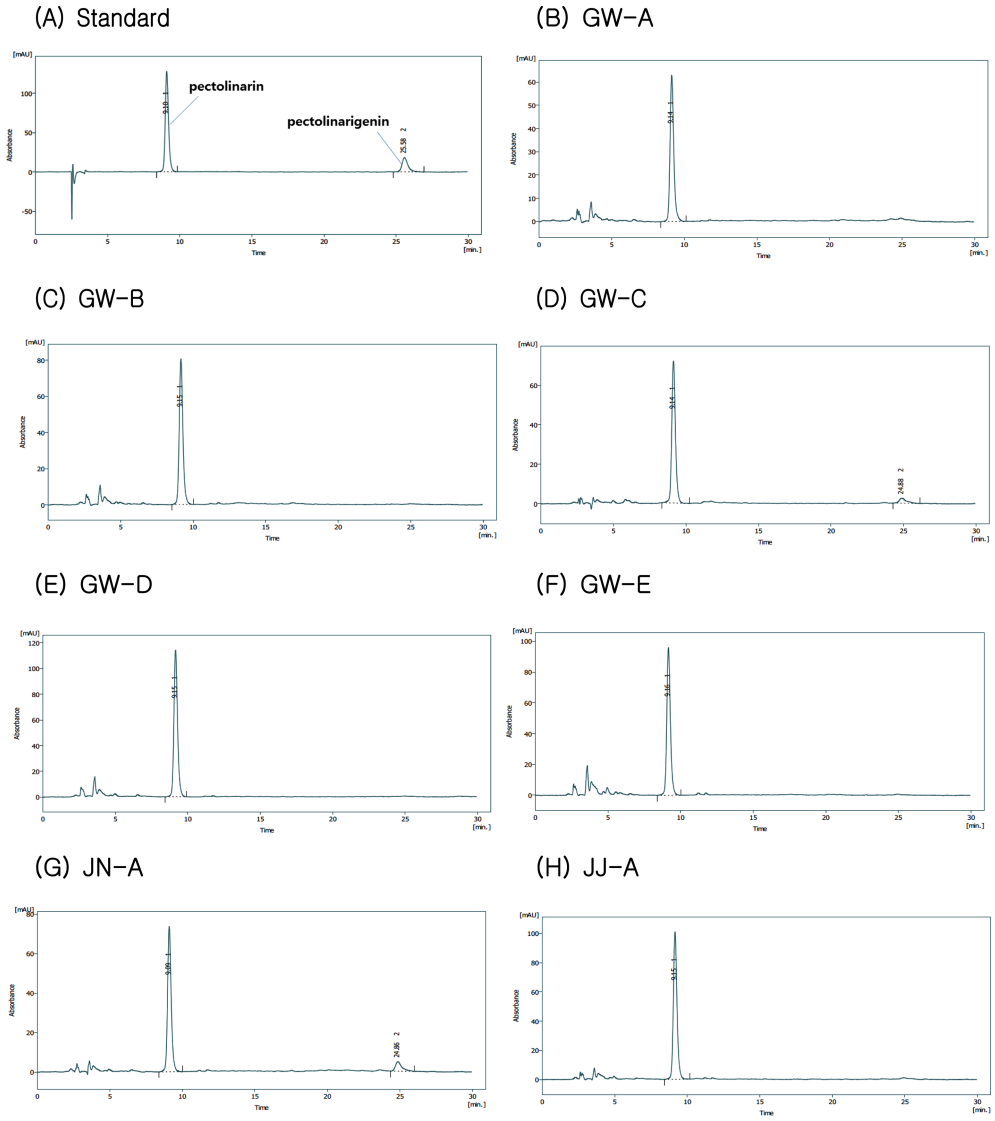

Fig. 1. HPLC chromatogram of standard mixture and *C. setidens* Nakai by cultivars.

0.05 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

산지별 고려엉겅퀴의 pectolinarin 함량

산지별 고려엉겅퀴의 pectolinarin 함량을 분석한 결과는 Fig. 1과 같이 분석에 사용한 표준용액 pectolinarin 및 pectolinarigenin의 머무름 시간(retention time, RT)과 고려엉겅퀴 시료의 머무름 시간은 일치하였다. 산지별 고려엉겅퀴 추출물의 지표성분함량은 Table 3과 같이 pectolinarin 함량은 3.95 ± 0.05 ~ 7.29 ± 0.07 mg/g로 산지별 고려엉겅퀴 가운데 강원도 D농장(GW-D)에서 가장 높은 함량을 보였다. Pectolinarin의 비배당체인 pectolinarigenin의 경우에는 강원도 C농장(GW-C)과 전라남도 A농장(JN-A)에서 생산된 고려엉겅퀴에서 각각 0.10 ± 0.01, 0.19 ± 0.02 mg/g로 미량 검출되었다. Oh 등[18]의 보고에 의하면, pectolinarin 및 pectolinarigenin의 최대흡수파장을 340 nm로 ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인[19]에 근거하여 pectolinarin 및 pectolinarigenin의 검출한계는 각각 4.25 μg/mL, 2.46 μg/mL, 정량한계는 각 12.88 μg/mL, 7.46 μg/mL로 본 연구에서의 산지별 고려엉겅퀴의 pectolinarin 및 pectolinarigenin 함량은 유효한 값으로 판단되었다.

산지별 고려엉겅퀴의 총 플라보노이드 함량

플라보노이드는 식물에 의해 합성되는 폴리페놀 화합물의 가장 큰 부류로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매 등 대부분의 부위에 함유되어 있으며, 항산화 효과를 가지는데 더불어 항암작용 등의 효과가 보고되고 있다[20]. 산지별 고려엉겅퀴 추출물의 총 플라보노이드 함량은 pectolinarin equivalent (PNE)로 환산하여 Fig. 2와 같이 나타내었으며 총 플라보노이드 함량은 40.42 ± 0.91 ~ 76.70 ± 2.24 mg PNE/g 수준으로 측정되었다. 산지 가운데 전라남도 A농장(JN-A) 추출물에서 가장 높은 함량(76.70 ± 2.24 mg PNE/g)을 나타내었고 강원도 A농장(GW-A) 추출물에서(40.42 ± 0.91 mg PNE/g)로 가장 낮은 함량을 보였다. Jang 등[1]의 연구에 따르면 국내 자생 엉겅퀴 추출물의 경우 저농도에서는 시료간의 유의차가 없으며 함량이 높아질수록 자생지역에 따라 총 플라보노이드 함량의 차이가 크게 나타나는 것으로 보고된바 있다. 본 연구에서도 산지별 고려엉겅퀴 추출물의 총 플라보노이드 함량은 산지별로 상이한 값을 갖는 것으로 나타났다. 이는 산지별 고려엉겅퀴 시료의 지리적 요인과 기후요인 등에 영향을 받은 것으로 판단되며 이에 따라 고려엉겅퀴의 항산화 활성 및 지표성분 함량의 차이가 발생한 것으로 판단된다.

Table 2. The contents of pectolinarin and pectolinarigenin of *C. setidens* Nakai by cultivars

Sample No.	Pectolinarin (mg/g)	Pectolinarigenin (mg/g)
GW-A	3.95 ± 0.05[g]	N/D[2]
GW-B	5.08 ± 0.03[d]	N/D
GW-C	4.50 ± 0.01[f]	0.10 ± 0.01[b]
GW-D	7.29 ± 0.07[a]	N/D
GW-E	5.98 ± 0.08[c]	N/D
JN-A	4.71 ± 0.02[e]	0.19 ± 0.02[a]
JJ-A	6.49 ± 0.05[b]	N/D

[1]Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
[2]Not detected

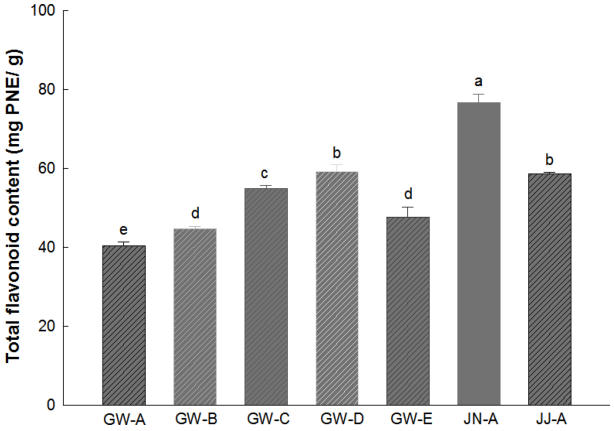

Fig. 2. Total flavonoid contents of *C. setidens* Nakai by cultivars. Total flavonoid contents expressed as pectolinarin equivalents (mg PNE/g). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

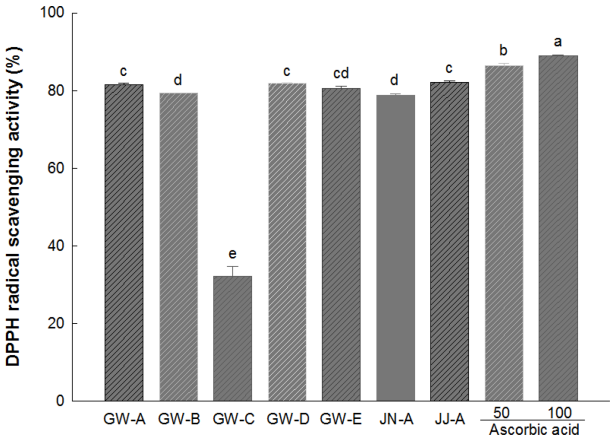

Fig. 3. DPPH radical scavenging activities of *C. setidens* Nakai by cultivars. Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

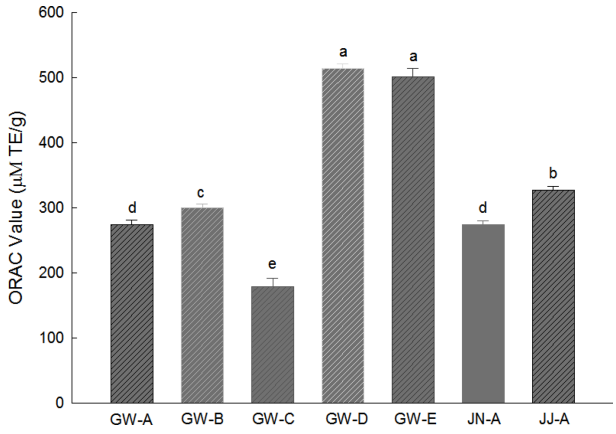

Fig. 4. ORAC value of *C. setidens* Nakai by cultivars. ORAC values expressed as Trolox equivalents (μM TE/g). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

산지별 고려엉겅퀴의 DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 DPPH 시약을 이용하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 실험이며 페놀성 화합물이나 플라보노이드와 같은 –OH기를 가진 물질에서 수소공여를 통한 라디칼의 소거로 자색 화합물이 노란색으로 탈색되는 원리는 이용하는 방법이다[21]. 산지별 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 산지별로 31.25% ~ 81.93%의 소거활성이 나타났으며 시판중인 ascorbic acid (0.05 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거활성과 강원도 A농장(GW-A), 강원도 D농장(GW-D), 제주도 A농장(JJ-A) 고려엉겅퀴 추출물(12.5 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거활성이 유사한 것으로 확인되었다.

국내에서 자생하는 엉겅퀴 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 평가한 Jang 등[1]의 연구에 따르면 엉겅퀴 추출물 0.1~1 mg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능은 약 15.71%-85.84%로 산지별로 유의적인 차이를 보인다고 보고하였다. 본 연구에서도 산지별 고려엉겅퀴 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 유사한 활성을 보여 유사한 경향을 나타내었다. 일반적으로 페놀성 화합물과 항산화 활성 간에 높은 상관관계를 나타낸다는 보고와는 달리 Nabasree 등[22]의 연구 결과에 따르면 항산화활성은 평가방법에 따라 효과가 상이하며, 항산화효과와 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량간의 상관관계는 시료에 함유된 bioactive compounds의 구성에 따라 다르게 나타난다고 보고된 사례가 있다. 본 연구에서도 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능 간의 뚜렷한 상관관계는 보이지 않아 다양한 항산화활성 평가 모델을 이용하여 상호보완적인 기능성 평가를 수행하여 기능성 원료로서의 자료를 구축하는 것이 필요하다고 판단되었다.

ORAC assay 측정

ORAC assay는 시료들을 인산 완충액에 용해하여 측정하며 AAPH에 의한 peroxy radical의 생성과 소멸에 따른 형광물질의 감소율을 평가하는 실험으로 radical chain reaction의 핵심단계인 수소 전자 전달과 연관하여 hydrophilic 성분과 hydrophobic 성분에 모두 반응하기 때문에 감도가 우수하며 응용범위가 넓다는 장점이 있다[23,24]. 산지별 고려엉겅퀴 추출물의 ORAC 지수를 측정한 결과는 Fig. 4와 같이 산지별로 179.62~514.49 μM TE/g의 값을 나타내었다. 특히 강원도 D농장(GW-D)과 강원도 E농장(GW-E)에서 각각 514.49, 501.73 μM TE/g 으로 가장 높은 ORAC 수치를 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 고려엉겅퀴 추출물에는 pectolinarin과 같은 플라보노이드화합물이 함유되어 있었으며 산지별로 차이를 보였으나 DPPH 라디칼을 소거하는 항산화활성을 갖는 것으로 나타났다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역주력산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

국문요약

본 연구에서는 국내산 고려엉겅퀴를 건강기능식품 소재로 활용시 기초자료 제공하고자 주요 산지별 pectolinarin 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH라디칼 소거능 및 ORAC 지수 등을 분석하였다. 산지별 고려엉겅퀴의 pectolinarin 함량은 3.95 ± 0.05 ~ 7.29 ± 0.07 mg/g로 강원도 D농장(GW-D)에서 가장 높은 함량을 보였다. 총 플라보노이드 함량은 산지별로 40.42 ± 0.91 ~ 76.70 ± 2.24 mg PNE/g 수준으로 전라남도 A농장(JN-A) 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었고 강원도 A농장(GW-A) 추출물에서(40.42 ± 0.91 mg PNE/g)로 가장 낮은 함량을 보였다. DPPH 라디칼 소거능의 경우, 산지별로 31.25% ~ 81.93%의 활성을 보였고, ORAC 지수는 산지별로 179.62~514.49 μM TE/g로 강원도 D농장(GW-D)과 강원도 E농장(GW-E)에서 각각 514.49, 501.73 μM TE/g 으로 가장 높은 ORAC 수치를 나타내었다. 결론적으로 고려엉겅퀴 추출물은 pectolinarin과 유용성분을 함유하고 DPPH 라디칼 소거능 및 ORAC 활성 등의 항산화활성을 갖는 것으로 나타났다.

References

1. Jang M.R., Hong E.Y., Cheong J.H., Kim G.H.: Antioxidative components and activity of domestic *Cirsium japonicum* Extract. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 739-744 (2012).
2. Lee D.G., Kim H.K., Park Y., Park S.C., Woo E.R., Jeong

H.G., Hahm K.S.: Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. *Arch. Pharm. Res.,* **26**, 597-600 (2003).
3. Lee S.H., Jin Y.S., Heo S.I., Shim T.H., Sa J.H., Choi D.S., Wang M.H.: Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean J. Food Sci. Tech*., **38**, 571-576 (2006).
4. Surh J.H, Kim J.O., Kim M.H., Lee J.C., Lee B.Y., Kim M.Y., Yang H.W., Yun S.J, Jeong H.R.: Nutritional properties, as food resources for menu development, of cubed snail fish, shaggy sea raven, and two kinds of wild vegetables that are staple products in Samcheok. *Korean J. Food Cookery Sci*., **25**, 690-702 (2009).
5. Lee W.B., Kwon H.C., Cho O.R., Lee K.C., Choi S.U., Baek N.I., Lee K.R.: Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.,* **25**, 628-635 (2002).
6. Lee S.J.: Korean folk medicine. Seoul National University Press, Seoul, Korea. pp. 145-146 (1966).
7. Ishida H., Umino T., Tsuji K., Kosuge T.: Studies on antihemmorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull(Tokyo),* **35**, 861-864 (1987).
8. Kang I.J., Ham S.S., Chung C.K., Lee S.Y., Oh D.H., Choi K.P. Do J.J.: Development of fermented soy sauce using *Cirsium setidens* Nakai and comfrey. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.,* **26**, 1152-1158 (1997).
9. Kim E.M.: Antioxidant and Anticancer effects of Extracts and Components from *Artemisia princeps Pampanini* and *Cirsium setidens* Nakai. *J. East Asian Soc. Dietary Life,* **21**, 871-876 (2011).
10. Kim J.E.: Effects of *Cirsium setidens* on the immune responses to Balb/c mouse. *M.S Dissertation*. Chungnam University, Daejeon, Korea.
11. Lee S.H., Jung M.J., Heo S.I., Wang M.H.: Anti-inflammatory effect and HPLC analysis of extract from edible *Cirsium setidens*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52**, 437-442 (2009).
12. Kim Y.H., Bae D.B., Park S.O., Lee S.J., Cho O.H., Lee O.H.: Method validation for the determination of eleutherosides and β-glucan in *Acanthopanax koreanum. J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.,* **42**, 1419-1425 (2013).
13. KFDA. Guideline for standard of health functional food. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008).
14. Jung T.D., Shin G.H., Kim J.M., Oh J.W., Choi S.I., Lee J.H., Cho M.L., Lee S.J., Heo I.Y, Park S.J., Kim S.U., Jung C.S., and Lee O.H.: Changes in lignan content and antioxidant activity of fermented sesame (*Sesame indicum* L.) by cultivars. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.,* **45**, 143-148 (2016).
15. Kim I.S., Yang M.R., Lee O.H., Kang S.N., Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *Int. J. Mol. Sci.,* **12**, 4120-4131 (2011).
16. Ozgen, M., Reese, RN., Tulio, AZ., Scheerens, JC., Miller, AR.: Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.,* **54**, 1151-1157 (2006).
17. Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, JA., Prior RL.: High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.,* **50**, 4437-4444 (2002).
18. Oh J.W., Lee J.H., Cho M.L., Shin G.H., Kim J.M., Choi S.I., Jung T.D., Kim Y.H., Lee S.J. , Lee B.J., Park S.J., and Lee O.H.: Development and validation of analytical method for pectolinarin and pectolinarigenin in fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.,* **44**, 1504-1509 (2015).
19. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, San Diego, CA, USA. pp. 1-13 (2005).
20. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.,* **13**, 572-584 (2002).
21. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C.: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.*, **30**, 609-615 (1997).
22. Nabasree D. Bratati De.: Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.,* **101**, 471-474 (2007).
23. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.,* **50**, 3122-3128 (2002).
24. Kim S.H., Kim Y.M..: Determination of the antioxidant capacity of korean ginseng using an ORAC assay. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **17**, 393-401 (2007).