

우영 뿌리 추출물의 항산화 및 Tyrosinase 저해 활성과 Phenolic Compound 분석

임도연¹ · 이경인^{2,3*}

¹광주여자대학교 교양교직과정부, ²동신대학교 생물자원산업화지원센터, ³조선대학교 바이오신약개발학과

Antioxidative Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Extract and Fractions from *Arctium lappa* Roots and Analysis of Phenolic Compounds

Do Youn Im¹ and Kyoung in Lee^{2,3*}

¹Division of Liberal Arts and Teacher Training, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713, Korea

²Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju 520-811, Korea

³Department of Bio New Drug Development, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

Abstract – In this study, we investigated on antioxidative activities and tyrosinase inhibitory activities of methanol extract and its fractions from roots of *Arctium lappa*. The total phenolic compound and flavonoid content of the ethylacetate fraction was found to be 818.29 mg/g and 360.59 mg/g as the highest content. In the measurement of DPPH radical scavenging ability and tyrosinase inhibitory activity, the ethylacetate fraction was higher than the other fractions and the extract. In addition, comparative analysis of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry (MS)/MS system under the multiple-reaction monitoring (MRM) with negative-ion electrospray ionization mode. The main phenolic compounds in the extract and fractions of roots from *Arctium lappa* were cynarin and chlorogenic acid. The main phenolic compound of the ethylacetate fraction was cynarin. *n*-Butanol fraction had a significantly higher chlorogenic acid content than other samples. In conclusion, DPPH radical scavenging ability and tyrosinase inhibitory activity of the cynarin-riched ethylacetate fraction showed the highest activity.

Key words – *Arctium lappa*, Antioxidative activity, Cynarin, Chlorogenic acid, Tyrosinase inhibitory activity

우영(*Arctium lappa* L.)은 국화과에 속한 2년생 초본으로서 우리나라를 포함한 아시아 지역에서 뿌리부위가 식품의 용도로 오랫동안 사용되어 왔다. 생약재로서 성숙한 과실이 우방자(牛蒡子)라 하여 해열이나 해독 등의 용도로 이용되고 있으며, 종자나 잎 부위도 민간요법이나 한방에서 이노제 등의 목적으로 사용되고 있다. 식품으로 주로 이용되는 뿌리는 섬유질과 함께 이눌린 형태로 주로 존재하는 당질로 인해 당뇨병이나 신장 질환에 도움이 되며, 항산화 및 항돌연변이 활성, 항염증 활성 등의 효과와 함께 고혈압이나 동맥경화증에도 유용한 것으로 알려져 있다.¹⁻⁶⁾ 이러한 유용성들의 배경으로 우영의 각 부위에 함유되어 있는 actiin이나 arctigenin, cynarin 등과 같은 phenolic compound들에 의한 free radical 소거 활성이 중요하게 작용하는 것으로 보

고되고 있으나 각 성분과 활성의 연관 관계에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.^{7,8)}

현대 사회에서 들어서 특정 연령층이나 성별에 상관없이 피부 분야에 대한 관심이 높아지고 있다. 이런 경향 속에서 피부 미백에 대한 관심이 고조되고 있는데, 자외선 등 다양한 환경적 스트레스 요인으로 인한 색소 침착에 대처하려는 노력이 의약품이나 화장품 등을 중심으로 나타나고 있다. 피부 미백에 관련된 연구는 tyrosinase 억제 활성, 항산화 활성, 자외선 차단 등이 주로 이루어지고 있는데, 각질 형성세포에 존재하는 melanin의 양상에 따라 피부색이나 색소침착여부가 좌우되므로 melanin 생성과정에 관여하는 효소인 tyrosinase를 저해하는 활성이 중요시 되고 있으며, 생약재 등 천연물에서 이와 관련된 활성을 가진 소재를 찾으려는 연구가 진행되고 있다.⁹⁻¹⁵⁾

이에 본 연구에서는 아직까지 보고된 바 없는 우영의 미백 기능성과 관련된 활성이나 성분에 대한 연구를 위해 그

*교신저자 (E-mail): kilee@bic.re.kr
(Tel): +82-61-336-3104

동안 주로 식용으로 이용되어 왔던 우엉 뿌리의 methanol 추출물과 용매분획별 시료를 대상으로 실험을 진행하였다. 활성에 대한 연구로서 항산화활성과 피부 미백관련 기능성으로 tyrosinase 저해 활성을 조사하였으며, 활성 성분에 대한 정성 분석과 정량적 비교를 통한 활성과의 연관 관계 파악을 위해 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS)를 이용한 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 본 실험에 사용된 우엉 뿌리는 2013년 3월 경북 안동에서 구입한 것으로 수세 후 두께 1 cm 이하의 절편으로 하여 동결건조를 실시한 후 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 표본은 동신대학교 생물자원산업화지원센터에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - LC-MS/MS로서 Agilent Technology(USA)의 6410A triple quadrupole 질량분석기를 사용하였으며, 분석용 column은 GL science(Japan)의 Inertsil C8(4.6×150 mm, 5 μm)을 사용하였다. 분석용 이동상으로서 JT Baker사의 LC grade 용매를 사용하였으며, 추출 및 분획에 사용된 용매는 동양제철화학에서 생산된 것을 이용하였다. Ascorbic acid, arbutin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), tyrosinase (mushroom), chlorogenic acid, rutin 등의 시약은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

추출 및 분획 - 동결건조한 우엉 뿌리 시료 130 g을 blender를 사용하여 마쇄한 후 99.4% methanol을 추출 용매로 하여 상온에서 24시간 3회 반복하여 추출을 실시하였다. 추출액은 여과와 농축 및 동결건조를 실시하여 추출물 48.2 g을 획득하였으며, 이중 20 g을 증류수에 분산시킨 후 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 용매 분획을 실시하였다. 분획된 시료는 여과와 농축 및 동결건조 후 추출물과 함께 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 최종 분획수율은 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol 및 aqueous 분획이 각각 1.54%, 2.89%, 7.56%, 88.01%로 나타났다.

DPPH Radical 소거능 측정 - 우엉 뿌리 추출물 및 분획물 시료의 항산화활성을 비교하기 위해 DPPH를 사용하여 radical 소거능을 측정하였다.¹⁶⁾ 각 시료를 methanol에

0.1~10 mg/ml의 다양한 농도로 용해시킨 시료액 20 μl와 200 μM로 용해시킨 DPPH 용액 180 μl를 혼합하여 15분간 암실에서 반응시킨 후 microplate reader(BIO-TEK, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 바탕으로 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 농도(SC₅₀)를 계산하였다. Positive control로 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였다.

총 Polyphenol 함량 측정 - Folin-Denis법을 이용하여 우엉 뿌리 추출물 및 분획물 시료의 polyphenol 함량을 측정하였다.¹⁷⁾ Methanol에 1 mg/ml농도로 용해시킨 시료액 80 μl와 Folin-Denis reagent 80 μl를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤 10% Na₂CO₃ 80 μl를 혼합하여 1시간동안 암실에서 반응시킨 후, 상등액 120 μl를 취하여 96well plate에 옮겨 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 chlorogenic acid를 0~500 μg/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 총 polyphenol 함량을 mg/g로 나타내었다.

Flavonoid 함량 측정 - 페놀성 화합물중 특히 여러 가지 기능성을 나타내는 것으로 알려진 flavonoid 함량을 알아보기 위해 Moreno 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다.¹⁸⁾ 1 mg/ml 농도로 methanol에 용해시킨 시료액 100 μl와 10% aluminium nitrate 20 μl, 1 M potassium acetate 20 μl, methanol 860 μl를 차례로 혼합하여 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin 0~500 μg/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 flavonoid 함량을 mg/g으로 나타내었다.

Tyrosinase 저해 활성 측정 - Tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 방법으로 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다.⁹⁾ 0.1 M phosphate buffer 100 μl와 농도별 시료 액 20 μl를 혼합하여 5분간 실온에서 반응시켰다. 반응 액에 0.1 M phosphate buffer에 용해시킨 tyrosinase(1K unit/ml) 30 μl와 1.5 mM tyrosine 30 μl를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액 대신 buffer 용액을 사용한 blank의 흡광도를 기준으로 저해 활성을 산출하였고, positive control로 arbutin를 사용하였다.

LC-MS/MS를 활용한 phenolic compound 분석 - 우엉

Table I. LC-MS/MS parameters of phenolic compounds in the extract and fractions from *Arctium lappa* roots

Compounds	Precursor ion [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Product ions[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
Chlorogenic acid	353	191	135	10
Cynarin	515	353, 191	120	5
Arctiin	533	371	100	10
Arctigenin	371	356, 151	120	5

의 뿌리 부위에서 발견될 수 있는 활성 성분들의 분석을 위해 negative electrospray ionization((-) ESI) mode로 설정된 LC-MS/MS를 활용하였다. Nebulizer 압력, N₂ gas 유속 및 온도는 각각 35 psi, 10 l/min, 320°C로 설정하였으며, capillary voltage는 4 kV를 유지하였다. 이동상으로서 A 용액은 5 mM ammonium acetate가 혼합된 0.1% formic acid 수용액이었고 B 용액은 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile을 사용하였으며, 0.5 ml/min의 유속으로 20% B로 시작하여 15분까지 순차적으로 100% B로 올려준 후 다시 20% B로 낮춰서 총 30분 동안 분석을 실시하였다. 시료 주입량은 10 µl로 하였으며, 각 성분별로 Table I과 같은 multiple reaction monitoring(MRM) 조건에서 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

총 Polyphenol 및 Flavonoid 함량 - Polyphenol과 flavonoid는 항산화, 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있어서 생약재를 포함한 각종 식물 대상 연구에서 그 함량이 중요하게 다루지고 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 우엉 뿌리 추출물 및 분획물 시료의 polyphenol과 flavonoid 함량을 측정된 결과를 Table II에 나타내었다. 추출물 중 polyphenol 함량이 14.93 mg/g으로 나타났고, 용매 분획별 시료에서 ethylacetate 분획물의 함량이 818.29 mg/g으로 다른 시료에 비해 월등히 높게 나타났으며, *n*-butanol 분획물의 함량은 203.18 mg/g으로 나타나 추출물 중 대부분의 polyphenol 성분이 두 가지 용매 분획물에 분리되어 나온 것으로 확인되었다. 특히, ethylacetate 분획물의 이와 같은 polyphenol 함량은 다른 생약재를 대상으로 한 기존의 연구들에서 나타난 결과들보다 월등히 높은 수준임을 알 수 있었다.^{12,13)}

Polyphenol과 마찬가지로 flavonoid 함량에서도 ethylacetate 분획물과 *n*-butanol 분획물의 함량이 각각 360.59 mg/g와 73.07 mg/g으로 다른 시료 조건보다 높게 나타났다.

DPPH Radical 소거능 - 기존 연구에서 확인된 바 없었던 용매별 분획물을 포함한 우엉 뿌리 추출물 시료의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH radical 소거능을 측정하여 Table III에 나타내었다. 농도별로 실시된 DPPH radical 소거능 결과를 바탕으로 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 산출한 SC₅₀ 값을 비교한 결과, ethylacetate 분획물의 소거능이 0.182 mg/ml로 가장 뛰어난 것으로 나타났으며, 다음으로 *n*-butanol 분획물의 SC₅₀이 0.826 mg/ml로 나타났다. 이와 같은 소거능을 positive control로 사용된 ascorbic acid의 SC₅₀ 값을 기준으로 비교한 결과, ethylacetate 분획물의 활성이 39.01% 수준으로 상당히 높게 나타났고 *n*-butanol 분획물은 8.60% 수준으로 확인되었다. 한편, aqueous 분획물과 *n*-hexane 분획물의 소거능이 현저

Table II. Total polyphenol and flavonoid contents of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots

	(unit: mg/g)	
	Total phenolic compound	Flavonoid
Methanol extract	14.93±4.91 ¹⁾	7.03±2.31
<i>n</i> -Hexane fraction	3.95±1.30	3.42±1.13
Ethylacetate fraction	818.29±128.27	360.59±41.96
<i>n</i> -Butanol fraction	203.18±16.28	73.07±8.53
Aqueous fraction	3.73±1.23	0.80±0.26

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

Table III. DPPH radical scavenging abilities of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots

	SC ₅₀ (mg/ml) ¹⁾	Relative activity ²⁾
Methanol extract	2.074±0.566 ³⁾	3.42
<i>n</i> -Hexane fraction	11.700±0.090	0.61
Ethylacetate fraction	0.182±0.003	39.01
<i>n</i> -Butanol fraction	0.826±0.008	8.60
Aqueous fraction	5.823±0.083	1.22
Ascorbic acid ⁴⁾	0.071±0.003	100.00

¹⁾SC₅₀: concentration of each samples for scavenging 50% of DPPH radical. ²⁾Relative activity: a ratio of SC₅₀ value compared to positive control. ³⁾Values are mean±SD (n=3) without relative activity. ⁴⁾Positive control.

히 낮은 것으로 나타났으며, 추출물의 소거능보다도 낮은 수준이었다. 이와 같은 결과는 Table II의 phenolic compound와 flavonoid 함량 측정의 결과와 유사한 양상임을 확인할 수 있는데, 이는 DPPH radical 소거능이 phenolic compound의 함량과 밀접한 연관관계가 있음을 나타낸 것이라 할 수 있다.

Tyrosinase 저해 활성 - 인간의 피부색은 다양한 인자에 의해서 달라지게 되지만 melanin이라는 피부색소의 영향이 가장 크다고 알려져 있다. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte 내의 melanosome에서 생합성된 후 표피의 각질세포로 이동하여 피부색을 나타내게 된다. 이러한 melanin은 적당량 존재함으로써 자외선과 같은 자극으로부터 피부를 보호해주는 기능을 나타내지만 과도한 색소 침착은 오히려 피부노화 증상을 가져오는 요인으로 작용하게 된다. Tyrosinase는 피부에 침착되는 색소인 melanin 형성에 있어 중요한 단계를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있어서 피부 미백과 관련된 연구에서 활성의 주요 판단 근거로 사용되고 있다.^{9,22)} 본 연구에서는 지금까지 보고된 바 없는 우엉 뿌리 추출물 및 분획물의 tyrosinase 저해 활성을 조사하였으며, 측정된 결과는 Table IV에 나타내었다. 추출물에서는 확인하기 어려웠던 저해 활성이 ethylacetate 분획

Table IV. Tyrosinase inhibitory activities of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots

	IC ₅₀ (mg/ml) ¹⁾	Relative activity ²⁾
Methanol extract	> 4	-
<i>n</i> -Hexane fraction	> 4	-
Ethylacetate fraction	1.326±0.158 ³⁾	14.33
<i>n</i> -Butanol fraction	3.881±0.337	4.90
Aqueous fraction	> 4	-
Arbutin ⁴⁾	0.190±0.006	100.00

¹⁾IC₅₀: concentration of each samples for inhibiting 50% of tyrosinase. ²⁾Relative activity: a ratio of IC₅₀ value compared to positive control. ³⁾Values are mean±SD (n=3) without relative activity. ⁴⁾Positive control.

물과 *n*-butanol 분획물에서 일정 수준 이상 확인되었다. Positive control로 사용된 arbutin의 활성과 비교하여 ethylacetate 분획물과 *n*-butanol 분획물의 저해 활성이 각각 14.33%와 4.90%에 해당하는 수준인 것으로 나타났다.

LC-MS/MS를 활용한 Phenolic Compound 분석 - 우영 뿌리에 존재하는 주요 활성 성분에 대한 분석을 위해 (-)ESI

장치가 부착된 LC-MS/MS 분석을 실시하여 얻어진 chromatogram을 Fig. 1에 제시하였다. 본 연구에서 분석을 실시한 4가지 성분 중 chlorogenic acid와 cynarin이 존재함을 확인할 수 있었는데, 추출물 분석 결과를 기준으로 산출한 chlorogenic acid와 cynarin의 상대적인 검출량을 Fig. 2에 나타내었다. Chlorogenic acid는 *n*-butanol 분획물에서 가장 높은 함량을 가지는 것으로 나타났고 cynarin은 ethylacetate 분획물에 주로 존재하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 함량은 Table III와 IV의 DPPH radical 소거능과 tyrosinase 저해활성에서 ethylacetate 분획물이 다른 시료에 비해 월등히 높은 수준의 활성을 나타낸 것과 관련성이 높은 것으로 판단되는데, chlorogenic acid의 함량보다는 cynarin 함량이 활성의 수준에 결정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

한편, 기존의 연구들에서 우영의 종자인 우방자에 존재하는 것으로 보고한 활성 성분인 actiin과 arctigenin⁸⁾을 LC-MS/MS로 동시에 분석을 실시한 결과에서 검출한계 미만으로 나타나 우영의 뿌리 부위에는 존재하더라도 극미량일 것으로 판단되었다.

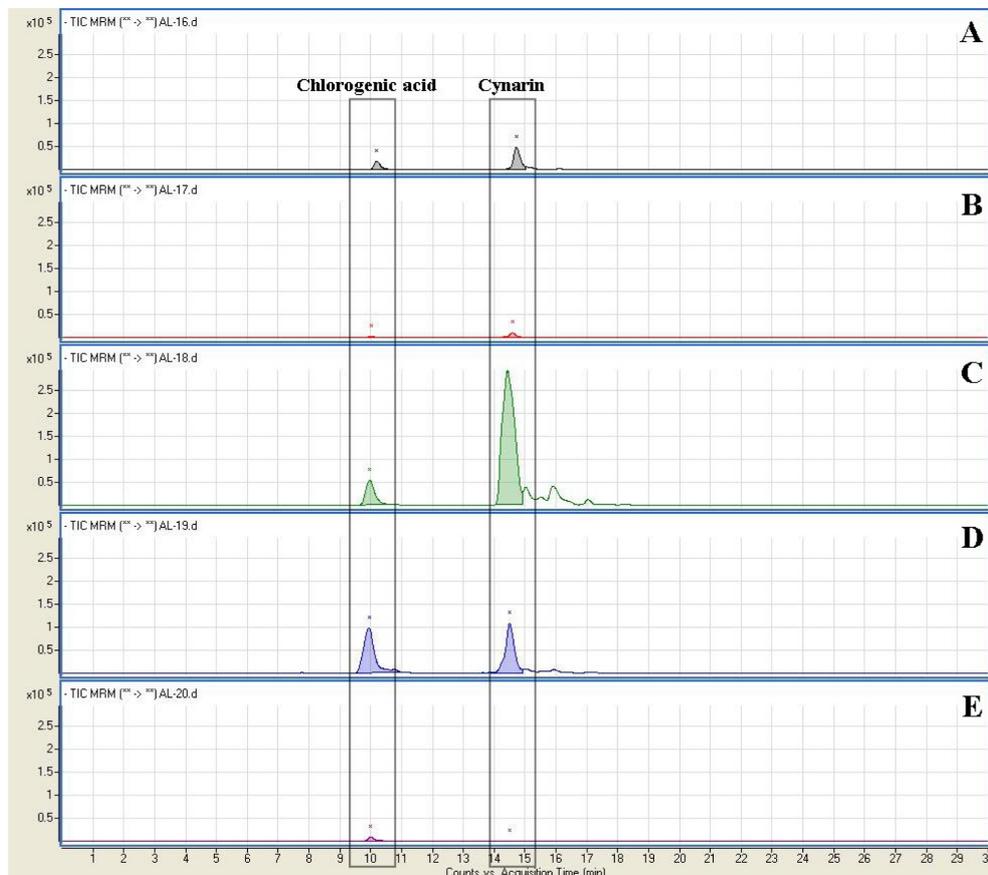


Fig. 1. MRM chromatograms of the extract (A), *n*-hexane fraction (B), ethylacetate fraction (C), *n*-butanol fraction (D) and aqueous fraction (E).

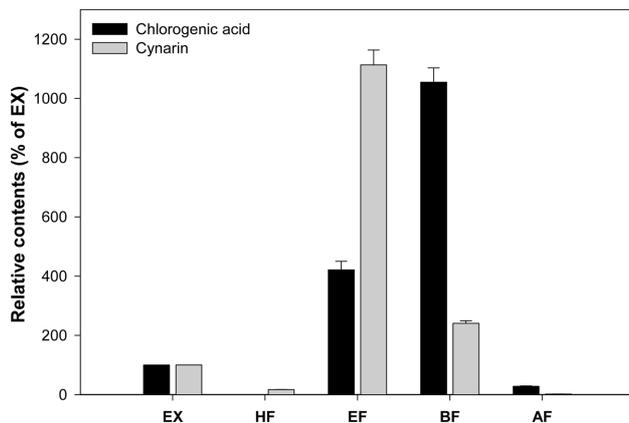


Fig. 2. Relative contents of chlorogenic acid and cynarin in the extract and fractions from *Arctium lappa* roots. Relative contents: a ratio of the peak area compared to EX. Values are mean \pm SD(n=3). EX: methanol extract, HF: *n*-hexane fraction, EF: ethylacetate fraction, BF: *n*-butanol fraction, AF: aqueous fraction.

결론

본 연구에서는 우엉 뿌리의 생리활성 탐색을 위해 methanol 추출물과 용매별 분획물을 대상으로 polyphenol과 flavonoid 함량, DPPH radical 소거능과 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 활성 성분의 함량이나 활성 실험의 결과에서 우엉 추출물의 ethylacetate 분획물이 가장 우수한 것으로 나타났으며, *n*-butanol 분획물이 다음으로 높은 수준을 보여주었다. 특히 미백 기능성과 관련하여 우엉 뿌리 부위의 추출물 및 분획물을 대상으로 한 tyrosinase 저해활성에 대한 연구 보고는 지금까지 없었던 것으로 관련된 연구의 기초 자료로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 활성을 나타내는 성분에 대한 정보를 얻기 위해 기존 연구들을 바탕으로 LC-MS/MS를 이용한 성분분석을 실시한 결과에서 cynarin과 chlorogenic acid가 우엉 뿌리 부위에 존재하는 주요한 활성 성분임을 확인할 수 있었다. 특히, ethylacetate 분획물에 가장 많이 존재하는 것으로 확인된 cynarin이 본 연구에서 실시된 항산화 및 미백 관련 활성에 효과를 나타낸 것으로 판단됨에 따라 추가적인 연구를 통하여 관련성을 밝힐 필요가 있을 것이다.

인용문헌

- Lee, M. S. (2011) Antioxidative and antimutagenic effects of *Arctium lappa* ethanol extract. *Korean J. Food & Nutr.* **24**: 713-719.
- Park, K. Y., Lee, K. I. and Rhee, S. H. (1992) Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**: 149-153.
- Han, S. J. and Koo, S. J. (1993) Study on the chemical composition in bamboo shoot, lotus root and burdock. *Korean J. Soc. Food Sci.* **9**: 82-87.
- Lim, J. H., Jeong, M. C. and Moon, K. D. (2005) Purification and characterization of polyphenol oxidase from burdock (*Arctium lappa* L.). *Korean J. Food Preserv.* **12**: 489-495.
- Kim, H. B., Park, H. U., Lee, J. Y. and Kwon, H. J. (2011) Lack of mutagenicity of green pigments in *Salmonella typhimurium*. *J. Food Hyg. Safety.* **26**: 242-247.
- Kim, Y. J., Kang, S. C., Namkoong, S., Choung, M. G. and Sohn, E. H. (2012) Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean J. Plant Res.* **25**: 1-6.
- Chen, F. A., Wu, A. B. and Chen, C. Y. (2004) The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem.* **86**: 479-484.
- Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V. and Ritieni, A. (2010) Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**: 399-404.
- Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. S. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 891-896.
- Cho, Y. H. (2008) Inhibitory effect of *Enteromorpha linza* on the melanogenesis in B16 melanoma cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **39**: 174-178.
- Lee, J. S., Kim J. A., Cho, S. H., Son, A. R., Jang, T. S., So, M. S., Chung, S. R. and Lee, S. H. (2003) Tyrosinase inhibitors isolated from the root of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 33-39.
- Lee, K. I., Yang, S. A., Pyo, B. S. and Kim, S. M. (2011) Antibacterial activity against pathogens of acne and tyrosinase inhibitory activity of extract and fractions from bark of *Prunus sargentii*. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 155-160.
- Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011) Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the extract and fractions from *Paeoniae Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 323-328.
- Kim, J. S., Seo, Y. C., Choi, W. Y., Kim, H. S., Kim, B. H., Shin, D. H., Yoon, C. S., Lim, H. W., Ahn, J. H. and Lee, H. Y. (2011) Enhancement of antioxidant activities and whitening effect of *Acer mono* Sap through nano encapsulation processes. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 191-197.
- Kim, T. H., Kim, J. M., Baek, J. M., Kim, T. W., Kim, D. J., Park, J. H. and Choi, M. (2011) Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **19**: 191-197.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.

17. Otto, F. and Denis, W. (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biological Chemistry*. **12**: 239-243.
 18. Moreno, M. I. N, Isla, M. I. N., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J. Ethnopharmacology* **71**: 109-114.
 19. Liu, R. H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention : mechanism of action. *J. Nutr.* 3479S-3485S.
 20. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 230S-242S.
 21. Dewick, P. M. (2002) Medicinal natural products, 149-151, Wiley & Sons, Chichester.
 22. del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**: 165-168.
- (2014. 4. 17 접수; 2014. 5. 2 심사; 2014. 6. 5 게재확정)