

Antioxidant activity of hot-water extracts and floral waters from natural plant pigments

Yeon-Soon Kim, Hwa-Jin Suh, Shin Park*

Division of Life and Environment, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea.

천연색소 함유 식물추출물과 플로럴 워터의 항산화 활성

김연순 · 서화진 · 박신*

대구대학교 생명환경학부

Abstract

The antioxidant potentials of ten kinds of medicinal plants used as natural dyeing agents were tested. Among the plant extracts and floral waters that were examined in this study, the antioxidant activities of the DPPH and ABTS radical scavengers increased with increasing amounts of the extracts. The hot-water extracts from *Aphis chinensis*, *Caesalpinia sappan L.*, *Rumex crispus L.*, and *Areca catechu* effectively inhibited the DPPH and ABTS radicals at concentration below 0.1 mg/mL. The floral water obtained through steam distillation from *Areca catechu*, *Rubia akane Nakai*, *Coptis chinensis*, and *Phellodendron amurense* showed relatively valid antioxidant activities. In particular, the natural colorants extracted from *Rumex crispus L.*, *Areca catechu*, and *Aphis chinensis* effectively suppressed the photogenerated singlet oxygen induced by a photosensitizer in *in-vitro* assay systems. The concentrations (IC₅₀) of the hot-water *Aphis chinensis* extract required to exert a 50% reduction effect on DPPH, ABTS, and singlet oxygen were found to be 8.5, 8.0, and 210 µg/mL, respectively. The study results suggest that extracts derived from naturally occurring colorants as well as floral waters could be used as natural antioxidants in the food and health-care industries.

Key words : antioxidant, floral water, natural colorant, singlet oxygen quenching

서 론

자연계에 존재하는 식물은 다양한 색소성분을 포함하여 20만여종의 다양한 화합물들을 생성하고 있다. 천연에서 유래된 색소는 역사 이전 시대부터 색을 표현하는 것뿐만 아니라 플라보노이드, 카로티노이드, 파이토에스트로젠 등 건강증진을 목적으로 사용되어져 왔다. 특히 빨강, 주황, 노란색을 띄는 카로티노이드는 식물의 꽃, 열매 및 뿌리에 선명한 색상을 제공할 뿐만 아니라 강한 빛으로부터 식물체 광합성계를 보호 하며 광합성계의 필수 구성성분으로 중요

한 역할을 한다 (1,2). 식물체내 존재하는 플라보노이드 성분들은 건강과 질병에 대한 예방과 같은 다양한 역할을 하고 있으며, 대부분의 플라보노이드 성분들은 생체내에서 항산화활성, 혈소판응집 억제, 항염증활성 및 항암작용 등을 도와주는 것으로 알려져 있다(3). 또한 과일과 야채 등과 같은 식물들은 암을 억제하는 등의 다양한 건강에 도움이 되는 성분인 isoprenoid 성분을 함유하고 있다. 이 화합물들은 tocotrienols과 monoterpenes을 함유하는 mevalonate pathway로부터 야기되어 진다. Terpenoids와 tocotrienols는 암 잠복기간을 늘리고 전이성을 억제하는 것으로 알려져 있다(4).

천연유래물질의 항산화 작용은 노화와 만성적 질병을 일으키는 활성산소를 제거하는 것이라 할 수 있는데, 산소는 인간에게 없어서는 안 될 필수 불가결한 물질이라는 점에서 매우 유익한 반면, 활성산소로 변환되어 질병을 일으키고 노화를 촉진시켜 생체에 큰 장애를 일으키는 것으로

*Corresponding author. E-mail : spark@daegu.ac.kr
Phone : 82-53-850-6751, Fax : 82-53-850-6759
Received 17 November 2014; Revised 23 January 2015;
Accepted 28 January 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

알려져 있다(5). 이러한 산화적 스트레스로부터 생체시스템을 보호하기 위해 항산화 기전이 존재하는데 그중 하나는 체내 존재하는 항산화 효소에 의해서, 나머지는 생체 내 여러 가지 항산화 물질과 식이를 통하여 공급되는 항산화제에 의한 것이다(6). 현재까지 천연 항산화제로는 비타민 E, 비타민 C, 탄닌, 안토시아닌, 카로티노이드, 플라보노이드 등이 있으며 생체 내에서 동맥경화, 염증, 퇴행성질환 및 암을 예방하는데 아주 효과적인 것으로 보고되고 있다(7,8). 이러한 천연 항산화제는 대부분 색을 띄고 있으며 전통적으로 사용되어져 온 천연염료의 주 성분과 일치한다. 최근에 안토시아닌류, 탄닌류, 커큐민류, 라이코펜 등 26종의 천연색소가 미국에서 사용허가를 받았다고 알려져 있으며, EU에서는 40여종의 색소가 첨가제로 등록이 되어 있다(9). 이러한 천연색소는 온도, 빛, 산화제, 환원제, 산도 및 보관성 등과 같은 요인에 의해 영향을 받을 수 있어 아직까지는 합성색소에 비해 산업적 적용성이 낮다고 할 수 있다. 일반적으로 천연에서 유래된 색소는 섬유 및 종이 염색에 사용하는 것으로 알고 있었으나 이들 색소성분의 다양한 기능성 및 안전성에 대한 연구를 통해 새로운 천연 항산화제로서의 가치 연구가 필요하다.

본 연구에서는 전통 천연염색에서 주로 사용되어져 온 천연염료 중에서 산화적 스트레스를 경감 소재로 활용할 수 있는지에 대한 기초연구를 수행하였으며, 폴리페놀성 색소화합물을 함유하고 있는 10종의 식물(소목, brazilin; 소리쟁이, emodin; 오배자, pyrogallol tannin; 황련, berberine+alkaloid; 황백, berberine; 천초근, pseudopurpurin; 빈랑, tannin; 자근, shikonin; 울금, curcumin; 치자, crocin)로부터 열수추출물과 정유성분을 함유하고 있는 플로럴워터의 항산화 활성에 대한 가치와 유용성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출조건

본 연구에서 사용되어진 원료 식물(소목, 소리쟁이, 오배자, 황련, 황백, 천초근, 빈랑, 자근, 울금, 치자)는 2014년 3월에 경북 영천시에서 구입하여 사용하였으며, 시료의 학명, 일반명 및 사용된 부위에 대해서는 Table 1에 나타내었다. 열수추출물과 플로럴워터 2종류의 시료를 준비하기 위하여 증류장치를 변형하여(Clevenger type apparatus) 건조된 시료 20 g에 2 L의 증류수를 넣고 3시간 동안 추출하였으며 이때 발생하는 증기를 플로럴워터 시료로 사용하였으며 남아 있는 추출액을 다시금 2 L로 부피를 맞춘 후 Whatman No. 2 여과지로 여과하여 고형분을 제거하고 동결건조하여 사용하였다. 실험에 사용된 용매 및 시약은 Dukan(GR grade), Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

총 페놀 함량 분석

추출된 시료의 총 폴리페놀 함량을 평가하기 위해 Folin-Ciocalteu법(10)을 이용하였다. 즉 시료 100 μ L와 Folin-Ciocalteu 시약 50 μ L, 20% Na_2CO_3 850 μ L를 혼합한 후 2시간 동안 암실에서 보관한 후, 분광광도계(UV-1800 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 765 nm에서 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 표준검량선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 시료 1 mg 중의 mg gallic acid로 계산하였다. Gallic acid의 농도는 10~500 mg/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 765 nm에서 흡광도를 평가하여 작성하였다.

Table 1. Plants and their parts that were used in this study

| Sample | | Part used |
|--|---------------|------------|
| Scientific name | Common name | |
| <i>Caesalpinia sappan</i> L. | Sappan wood | Heart wood |
| <i>Rumex crispus</i> L. | Rumex crispus | Whole |
| <i>Aphis chinensis</i> | Gall nut | Whole |
| <i>Coptis chinensis</i> | Coptis | Root |
| <i>Phellodendron amurense</i> | Amur cork | Bark |
| <i>Rubia akane Nakai</i> | Madder | Root |
| <i>Areca catechu</i> | Betel palm | Fruit |
| <i>Lithospermum carolinense</i> | Hairy Puccoon | Root |
| <i>Curcuma longa Radix</i> | Curcumin | Root |
| <i>Gardenia jasminoides var. grandiflora</i> | Gardenia | Fruit |

DPPH radical 소거활성 측정

Brand-Williams 등의 방법(11)에 따라 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성을 평가하였다. 6×10^{-5} M DPPH를 methanol에 녹인 후, DPPH 라디칼 용액 900 μ L와 시료 100 μ L를 혼합한 후 5분간 반응시킨 후 분광광도계(UV-1800, Shimadzu)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 평가하였다. DPPH 라디칼의 소거능은 아무 것도 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가 후 흡광도의 변화로 하여 다음 식으로 계산하였다.

$$DPPH\ radical\ 소거활성(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

시료의 농도별 DPPH 라디칼 소거능(전자공여능, %)을 도식화하여 전자공여능 50%일 때의 시료 농도를 50% inhibition concentration(IC₅₀)로 나타내었다.

ABTS radical 소거활성 측정

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 라디칼 소거활성을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolorization assay 방법(12)에 의하

여 측정하였는데, 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 섞어 12시간 이상 암소에 방치하여 청록색의 ABTS 라디칼을 형성시켜 냉장 보관하였으며, radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 $0.70(\pm 0.02)$ 이 되도록 에탄올로 희석하였다. 이 용액 0.9 mL에 농도별로 제조한 각 시료용액 0.1 mL를 가한 후 실온에서 7분간 반응시킨 후, 반응액의 흡광도 변화를 734 nm에서 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 정도는 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$ABTS\ radical\ 소거\ 활성(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의흡광도}}{\text{무첨가군의흡광도}}\right) \times 100$$

단일항산소 측정

Rose bengal(RB)의 광증감 반응에 의해 생성된 단일항산소를 측정하기 위하여 imidazole-RNO bleaching 방법(13)을 이용하였다. 단일항산소 분석은 2 μM rose bengal, 5 mM imidazole 그리고 4 μM RNO를 녹인 20 mM Tris-succinate buffer(pH 6.5) 반응액이 빛에 노출되기 전후 흡광도 변화를 440 nm에서 측정하여 나타내었다. 시료는 150 W halogen-lamp(Osram, Augsburg, Germany)로부터 백색광($\lambda > 400\text{ nm}$, 100 W/m^2)에 4분간 노출되어졌으며, 모든 분석은 25°C에서 이루어졌다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

페놀성 화합물은 자연계에 널리 분포하는 2차대사산물로서 대부분 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(14). 본 실험에서 사용되어진 다양한 천연색소 추출물의 총 페놀성 화합물 함량(total phenolic contents, TPC)의 분석 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 각 시료의 열수추출물의 TPC는 0.002~0.3 mg GA/mg extract의 범위를 나타내었는데 그중 오배자 추출물(EE)이 0.3 mg GA/mg extract로 다른 색소 추출물에 비해 월등히 높은 수준으로 분석되었다. 일반적으로 페놀성 화합물의 함량은 항산화력과 정의 상관관계를 나타내며(15), 본 실험 결과 천연색소 추출물에 따른 총 페놀 함량이 오배자, 소목, 빈랑, 소리쟁이, 황련, 천초근, 황백의 순으로 분석되어 졌다.

DPPH radical 소거활성

DPPH는 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 물질로 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이것은 다양한 천연 소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이

이용되고 있다(16). 천연색소로부터 얻어진 열수추출물과 플로럴워터의 전자 공여능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같은데, 색소 시료의 열수추출물 0.1 mg/mL 농도에서 DPPH 라디칼을 오배자 100%, 소목 100%, 소리쟁이 76.6%, 빈랑 63.8%, 천초근 33.4%, 황련 12.2%, 황백 7.2, 자근 7.2%를 소거하는 것으로 나타났으며, 10% 플로러워터 (0.1 mL) 처리시 DPPH 소거 활성은 빈랑에서 가장 우수한 결과가 나왔으며 그 다음으로 천초근, 황련, 황백, 소목의 순으로 열수추출물과는 다른 결과를 보였다. 비교 물질로 주로 사용되는 ascorbic acid 0.1 mg/mL 처리시와 비교해 볼때 오배자, 소목 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거능력은 상당히 높은 수준의 항산화력을 가지는 것을 확인하였다.

Table 2. Extraction yields and total phenolic contents of the hot-water extracts

| Sample | Yield (%) | TPC (mg GA/mg ext) |
|--|-----------|--------------------|
| <i>Caesalpinia sappan</i> L. | 8.82 | 0.182 |
| <i>Rumex crispus</i> L. | 4.22 | 0.036 |
| <i>Aphis chinensis</i> | 46.52 | 0.302 |
| <i>Coptis chinensis</i> | 20.1 | 0.026 |
| <i>Phellodendron amurense</i> | 21.86 | 0.015 |
| <i>Rubia akane Nakai</i> | 9.2 | 0.016 |
| <i>Areca catechu</i> | 7.58 | 0.061 |
| <i>Lithospermum carolinense</i> | 44.58 | 0.003 |
| <i>Curcuma longa Radix</i> | 11.34 | 0.002 |
| <i>Gardenia jasminoides var. grandiflora</i> | 29.72 | 0.002 |

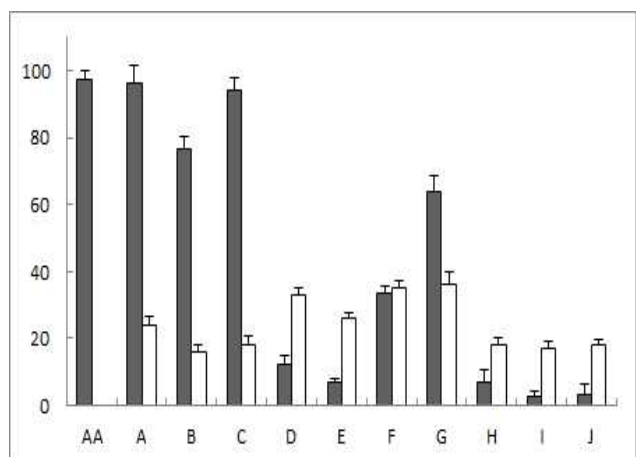


Fig. 1. Antioxidant activities of the hot-water extract (dark-gray bars) and floral water (open bars) of various plant-derived pigments.

DPPH in methanol was incubated with 0.1 mg/mL extracts and 0.1 mL/mL floral water at 25°C for 10 min, and the absorbance measured at 517 nm. The data are expressed as the mean \pm SD of the triplicate experiments (AA, ascorbic acid; A, *Caesalpinia sappan* L.; B, *Rumex crispus* L.; C, *Aphis chinensis*; D, *Coptis chinensis*; E, *Phellodendron amurense*; F, *Rubia akane Nakai*; G, *Areca catechu*; H, *Lithospermum carolinense*; I, *Curcuma longa Radix*; J, *Gardenia jasminoides var. grandiflora*).

ABTS radical cation 소거활성

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하면 ABTS 라디칼이 생성되는데 추출물의 항산화력에 의해 ABTS 라디칼이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색된다. 이와 같이 ABTS 라디칼 탈색반응은 이미 생성된 자유라디칼의 제거 정도를 흡광도로 나타내어 ABTS 라디칼의 소거활성능을 측정하는 방법으로 ABTS 라디칼 탈색반응이 1분 안에 종료되므로 단시간 측정할 수 있고, 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하다(17). 천연색소 열수추출물 및 플로럴 워터의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나와 있는바와 같이, 열수추출물 (0.1 mg/mL) 및 10% 플로랄 워터 (0.1 mL) 처리시의 ABTS 라디칼 소거능은 DPPH 소거능에서의 결과와 동일하게 오배자, 소목, 소리쟁이에서 가장 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인이 되었다. 또한 DPPH 라디칼 저해 활성이 ABTS 라디칼 저해 활성보다 높게 나온 경향을 볼 수 있는데 이는 ABTS 라디칼이 DPPH 라디칼 보다 좀 더 강력한 산화물질이기 때문인 것으로 사료된다(18).

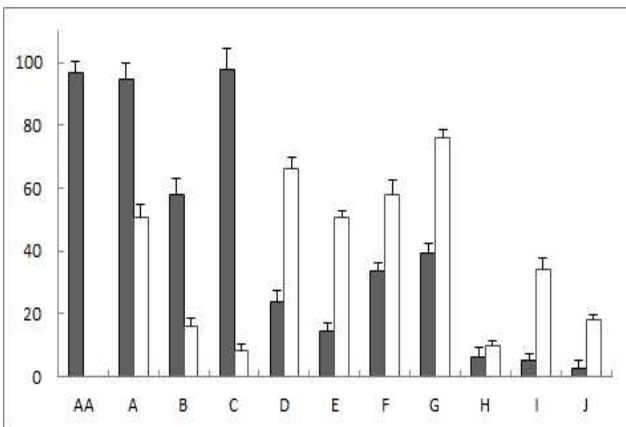


Fig. 2. Antioxidant activities of the hot-water extract (dark-gray bars) and floral water (open bars) of various plant-derived pigment.

The ABTS radical scavenging capacity of 0.1 mg/mL extracts and 0.1 mL/mL floral water were measured at 25°C for 5 min, and the absorbance was measured at 734 nm. The data are expressed as the mean±SD of the triplicate experiments. (AA, ascorbic acid; A, *Caesalpinia sappan* L.; B, *Rumex crispus* L.; C, *Aphis chinensis*; D, *Coptis chinensis*; E, *Phellodendron amurense*; F, *Rubia akane Nakai*; G, *Areca catechu*; H, *Lithospermum carolinense*; I, *Curcuma longa Radix*; J, *Gardenia jasminoides var. grandiflora*).

단일항산소 억제 효과

다양한 천연색소 열수추출물에 대한 단일항산소 억제 효과를 검증하기 위하여 광증감 반응(type-II photosensitization)에 의해 발생하는 단일항산소의 억제 효과를 분석하였다. 0.15 mg/mL 시료 처리에 따른 단일항산소 억제 효과는 Fig. 3에 나타내었는데, 단일항산소 억제 효과는 소목, 소리쟁이, 오배자, 빈랑에서 유의성을 보였으며 이러한 결과는 앞서 기술한 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능의 결과 유사하게 나타났다.

결론적으로, 전자공여능 50%일 때의 시료 농도를 50%

억제 농도값(50% inhibition concentration, IC₅₀)을 측정하여 10종의 천연색소 열수추출물에 대한 비교는 Table 3에서 나타내었다. 3가지 방법에 의해 얻어진 결과 동일하게 오배자, 소목, 소리쟁이, 빈랑 4종류의 천연색소 열수추출물에서 우수한 항산화 활성을 보이는 것으로 확인되었으며 특히 오배자는 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 IC₅₀(10.5 µg/mL)와 비교해 볼 때 매우 우수한 항산화활성을 나타내었다. 뿐만 아니라 빛에 의해 야기되는 단일항산소 소거능 결과로 보아 강한 광에 노출되었을 때 일어날 수 있는 생체기관의 광피해로부터 생명체를 보호하는 중요한 반응을 할 것이라고 판단한다. 향후 *in vivo* 실험 및 순물질 정제를 통해 심도 깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되며, 식품산업, 향장산업 및 의약산업에 적용한다면 활용성이 높을 것으로 사료된다.

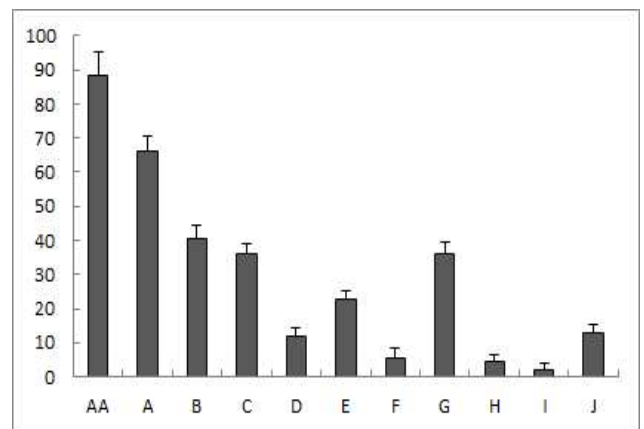


Fig. 3. Singlet oxygen quenching capacity of the hot-water extracts of various plant-derived pigments.

The data are expressed as the mean±SD of the triplicate experiments. (AA, ascorbic acid; A, *Caesalpinia sappan* L.; B, *Rumex crispus* L.; C, *Aphis chinensis*; D, *Coptis chinensis*; E, *Phellodendron amurense*; F, *Rubia akane Nakai*; G, *Areca catechu*; H, *Lithospermum carolinense*; I, *Curcuma longa Radix*; J, *Gardenia jasminoides var. grandiflora*).

Table 3. Antioxidant activities of the plant-derived pigments

| Sample | DPPH IC ₅₀ | ABTS ⁺ IC ₅₀ | Singlet oxygen IC ₅₀ |
|--|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Caesalpinia sappan</i> L. | 19.1 ¹⁾ /207 ²⁾ | 31.8/98.3 | 120/- |
| <i>Rumex crispus</i> L. | 64.4/310.6 | 85.1/314.15 | 190/- |
| <i>Aphis chinensis</i> | 8.5/272.8 | 8.0/619.2 | 210/- |
| <i>Coptis chinensis</i> | 356.9/151.1 | 213.4/73.9 | 620/- |
| <i>Phellodendron amurense</i> | 677.6/191.7 | 405.8/98.1 | 340/- |
| <i>Rubia akane Nakai</i> | 149.2/145.1 | 149.8/85.4 | 1420/- |
| <i>Areca catechu</i> | 78.0/138.9 | 136.6/64.3 | 210/- |
| <i>Lithospermum carolinense</i> | 703.2/278.2 | 744.1/509.3 | 1590/- |
| <i>Curcuma longa Radix</i> | 3400/189.3 | 1600/146.2 | 3570/- |
| <i>Gardenia jasminoides var. grandiflora</i> | 2100/269.4 | 2200/272.9 | 580/- |

¹⁾IC₅₀ value of hot water extracts (µg/mL).

²⁾IC₅₀ value of floral water (µL/mL).

요약

이 연구의 목적은 전통적으로 사용되고 있는 천연염색의 원료인 천연염료, 즉 천연색소의 열수추출물과 플로랄워터의 항산화 활성을 확인하는 것이다. 항산화 활성은 총 페놀 함량 분석과 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 단일항산소 억제 효과로 확인하였다. 열수추출물에서 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내는 IC₅₀ 값은 0.0085~3.5 mg/mL를 나타내어 일부 색소 추출물의 DPPH 소거 활성이 우수하다는 것을 알 수 있었다. 특히 오배자, 소목 추출물이 8.5 µg/mL, 19.1 µg/mL로 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었는데, 비교 물질로 주로 사용되는 ascorbic acid의 10.5 µg/mL 만큼 높은 우수한 항산화력을 가지는 것을 확인하였다. 단일항산소 억제 효과 역시 오배자, 소목 추출물에서 각각 0.21, 0.12 mg/mL을 나타내어 높은 소거 활성을 띄는 것으로 강한 빛에 의해 야기되는 활성산소의 피해로부터 생물체를 보호해주는 것을 알 수 있었다. 총 페놀 함량도 열수추출물에서 높은 수준을 나타내었다. 반면, 플로랄워터의 항산화 활성은 열수추출물 대비 미비한 효과를 보였으나 황련, 황벽천초근의 경우 열수추출물 보다 우수한 결과를 나타내었다. 플로랄워터의 경우 액상시료를 첨가하여 수행되는 실험 방법에 의해 정량적 수치를 명확히 나타내기 어렵기 때문에 연구방법적 측면에서 개선이 필요할 것으로 판단된다. 결론적으로 일부 천연색소 추출물은 생물체의 산화적 스트레스로부터 야기되는 활성산소를 억제하는 중요한 역할을 하며, 보다 심도 깊은 연구를 진행한다면 새로운 생물 소재로 활용성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의한 논문이며, 이에 감사드립니다.

References

1. Fiehn O (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 48, 155-171
2. Bartley GE, Scolnik PA (1995) Plant carotenoids : pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7, 1027-1038
3. Craig WJ (1997) Phytochemicals : guardians of our health. *J Am Diet Assoc*, 97, S199-S204
4. Elson CE, Yu SG (1994) The chemoprevention of cancer by mevalonatederived constituents of fruits and vegetables. *J Nutr*, 124, 607-614
5. Oyanagi Y (1989) SOD and active oxygen modulators. *Pharmacology and clinical trials*. Nihon-Igakukan, Tokyo, p 5-290
6. Branen AL (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*, 52, 59-65
7. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS (2005) Total polyphenol contents and antioxidant activities methanol extract from vegetable produced in Ullung island. *J Korean Food*, 37, 223-240
8. Ali KA, Abdelhak M, George B, Panagiotis K (2005) Tea and herbal infusions : their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chem*, 89, 27-36
9. Dabas D, Elias RJ, Lambert JD, Ziegler GR (2011) A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. *J Food Sci*, 76, C1335-C1341
10. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H (1996) Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem*, 44, 37-44
11. Szabo MR, Chambre D, Lupea AX (2007) Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay, Institute of Chemistry. *Slovak Academy of Sciences*, 61, 214-216
12. Roterta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radicalcation decolorization assay. *Free radical Biol Med*, 26, 1231-1237
13. Jung J, Kim H, Cho M (1990) Action spectra for the generation of singlet oxygen from mitochondrial membranes from soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Photochem Photobiol*, 52, 561-566
14. Madsen HL, Nielsen BR, Bertelsen G, Skibsted LH (1996) Screen of antioxidative activity of spices. *Food Chem*, 57, 331-337
15. Suh HJ, Kim SR, Lee KS, Kang SC (2010) Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda : Insecta) larvae. *J Photochem Photobiol B*, 99, 67-73
16. Al-sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn) and its therapeutic potentials. *J Indian Exp*, 37, 124-130
17. Lee YM, Lee JJ, Choi MY (1998) Antioxidative effect of *Pimpinella brachycarpa* ethanol extract. *J Life Sci*, 18, 467-473
18. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS, Kim. MH (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci*, 32, 723-727