pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 4, pp. 304~309 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.4.304

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

고려엉겅퀴 주정추출물의 안정성 조사

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

Stability of Ethanolic Extract from *Cirsium setidens* Nakai

Jin-Ha Lee[1], Yang-Hwan Cho[1], Bong-Yeon Cho[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* [4]*Hatti co. Ltd., Hongcheon 25142, Korea*
(Received June 17, 2016/Revised July 8, 2016/Accepted July 21, 2016)

ABSTRACT - This study was assessed stability of ethanolic extract from *Cirsium setidens* Nakai that will be applied for development of functional foods and ingredients. We evaluated pectolinarin content, total phenol content and antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity and FRAP assay) of ethanolic extract from *C. setidens* Nakai against various temperature (4, 25 and 50°C) and pH (4.0, 7.0 and 10.0). Our results show that the pectolinarin and total phenol contents in ethanolic extract from *Cirsium setidens* Nakai slightly reduced during the storage periods. Moreover, the DPPH radical scavenging activity at 4°C was higher than those of other temperature. Pectolinarin content, total phenol content and DPPH radical scavenging activity of ethanolic extract from *Cirsium setidens* Nakai at acidic (pH 4.0) and neutral (pH 7.0) pH ranges were higher than at alkaline pH ranges. These results indicate that the optimum storage condition of *C. setidens* Nakai ethanol extract are temperature 4°C and pH 4.0-7.0 ranges.

Key words : *C. setidens* Nakai, Stability, Pectolinarin, Antioxidant activity, Total phenol content

고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai)는 국화과(Asteraceae) 엉겅퀴(*C. japonicum var.* ussuriense)속 식물로 민간에서는 곤드레로 알려져 있다. 고려엉겅퀴의 잎과 순은 식품원재료 데이터베이스에 식품원료로 명시되어 있으며 수천 년 동안 나물과 비빔밥 등의 식품원재료로 사용되었다[1-2]. 고려엉겅퀴는 강원도 지역에서 중요한 산채자원의 하나로 최근 건강식품의 원료로도 관심도가 높아지면서 고려엉겅퀴에 대한 다양한 연구가 시도된 바 있다. 고려엉겅퀴의 영양성분 및 생리활성을 보고한 Lee 등[3]에 의하면 고려엉겅퀴는 항산화 활성, 간 보호 작용, 항염증 활성이 우수하며 주요 지표성분으로 pectolinarin 성분이 밝혀져 건강기능식품 원료로서 주요한 소재로 제시한바 있으며 Park과 Kim[4]은 동결건조 한 고려엉겅퀴 분말을 첨가하여 생면을 제조하였고 Kang 등[5]은 고려엉겅퀴를 이용하여 양조간장을 개발한 바 있다. 구황식물로서 활용되었던 고려엉겅퀴의 다양한 기능성이 밝혀지면서 건강기능식품 소재로서의 활용방안이 요구되고 있다.

건강기능식품 소재로 고려엉겅퀴를 활용하기 위해서는 원료 표준화를 통한 소재의 기능성 및 안전성 검증이 선행되어야 한다[6-7]. 또한, 표준화된 원료의 저장안정성을 평가하여 기능성 원료의 효능 유지, 저장 중의 지표성분의 변화 등 표준화된 추출물의 안정성 조사 연구가 필요하지만 아직 보고된 바 없다. Lee[8] 등과 Kim[9] 등은 천연물의 기능성 소재로 활용하기 위한 최적 추출조건 확립에 관한 연구로 올리브 잎과 유근피의 적정 추출조건 및 추출물의 안정성에 관한 연구에서 특정 추출조건 하의 주정 추출물의 경우가 유효 성분이 가장 많이 추출됨을 확인한 바 있으며 천연물의 건강기능식품 소재화를 위하여 추출물의 안정성을 조사한 연구로, Kim 등[10]은 감초 에탄올 추출물의 열 및 pH 안정성을 조사하였고, Yoon 등[11]은 모자반 에탄올 추출물이 121°C에서 15분간 열처리하고 pH 2.0-10.0으로 처리하여도 항균활성은 감소하지 않는다고 보고한 바 있다.

*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

따라서 본 연구에서는 고려엉겅퀴를 건강기능식품 소재로 활용가능성을 모색하기 위하여 고려엉겅퀴 주정추출물의 저장 중 열안정성, pH 안정성을 조사하고자 하였다. 고려엉겅퀴 주정추출물은 온도별(4, 25 및 50°C), pH별(4.0, 7.0, 및 10.0)로 저장하면서 추출물의 pectolinarin 함량, 총 페놀 함량, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 및 ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay 등을 분석하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

실험에 사용한 고려엉겅퀴 주정추출물 시료는 (주)하티에서 제공받았으며 예비실험을 통하여 40% 주정으로 70°C에서 2시간 추출하여 고려엉겅퀴 주정추출물을 제조한 후 동결건조 하여 분말화 하였다(data not shown). 저장안정성 실험을 위하여 고려엉겅퀴 추출물은 0.1% (1 mg/mL)의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후, 온도별(4, 25 및 50°C) 및 pH별(4.0, 7.0, 및 10.0)로 21일간 저장하면서 7일에 한번씩 sampling하여 실험하였다. 추출물의 안정성 조사에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-striazine (TPTZ) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, pectolinarin 표준물질(purity ≥ 98.0%)은 Carbosynth (Compton, Berkshire, UK)에서 구입하였다. 분석에 사용된 acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서, trifluoroacetic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, DMSO는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. HPLC conditions of pectolinarin analysis for *C. setidens* Nakai

Instrument	Conditions		
Column	Sunfire™ C18, 5.0 μm, 4.6 mm × 250 mm		
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector UV 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

Pectolinarin 분석

고려엉겅퀴에 함유된 pectolinarin의 분석을 위한 시료의 전처리는 Oh 등[12)]의 방법을 변형하여 제조하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Co., Milford, MA, USA)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Sunfire™ C18 (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Duval과 Shetty[13)]의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시료 1 mL에 2% follin-ciocalteau's phenol regent 1 mL 첨가한 후 10% Na_2CO_3 용액을 1 mL을 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후, 상등액을 취하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 Gallic acid를 이용하여 표준 검량곡선(y = 17.098x − 0.0415, R^2 = 0.9943)을 작성한 후, 총 페놀 함량을 계산하였다.

DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능은 Ozgen 등[14)]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 ethanol로 용해한 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 10분간 반응하였다. 그리고 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정한 후 시료의 DPPH radical 소거능은 다음 식에 의해 나타내었다.

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

FRAP 측정

FRAP은 Biglari 등[15)]의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM $FeCl_3{\cdot}6H_2O$를 제조하여 실험직전에 10:1:1의 비율로 혼합하여 FRAP용액을 제조하였다. FRAP용액 1.5 mL에 시료 50 μL, 증류수 150 μL를 첨가한 후 37°C에서 4분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

Pectolinarin 함량, 총 페놀 함량, 항산화 활성 결과 값의 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 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

Pectolinarin의 함량 변화

고려엉겅퀴의 주요 지표성분으로 알려진 pectolinarin의 구조는 flavone glycoside (5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone-7-O-rutinoside)로 진통과 항염, 항암작용 등이 보고되었다[16,17]. 고려엉겅퀴 추출물을 0.1%의 농도로 DMSO에 녹인 후 온도별(4, 25 및 50°C) 및 pH별(4.0, 7.0, 및 10.0)로 각각 21일간 저장하면서 pectolinarin 함량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 고려엉겅퀴 추출물의 초기 pectolinarin 함량은 203.40 ± 8.48 mg/g이었으나 저장기간이 증가함에 따라 pectolinarin의 함량은 다소 감소하는 경향을 보였다. 21일 저장 후 온도별 고려엉겅퀴 추출물의 pectolinarin 함량은 4°C에서 179.07 ± 4.63 mg/g, 25°C에서 158.46 ± 6.96, 50°C에서 180.56 ± 5.94 (50°C) mg/g로 각각 나타났다. pH별 고려엉겅퀴 추출물의 pectolinarin 함량은 각각 pH 4.0에서 175.62 ± 6.87 mg/g, pH 7.0에서 196.09 ± 1.94 mg/g, pH 10.0에서 100.33 ± 15.04 mg/g로 나타났다.

온도별(4, 25 및 50°C) 및 pH별(4.0, 7.0, 및 10.0) 고려엉겅퀴 추출물의 pectolinarin은 안정성은 온도에 의한 영향보다는 pH에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다. 즉, pH 7.0에서 가장 변화가 적었으며 pH 10.0에서 급격한 감소를 보였다. 이는 올리브 잎 추출물의 안정성 조사를 연구한 Lee 등[8]의 결과와 유사한 결과로 올리브 잎 추출물은

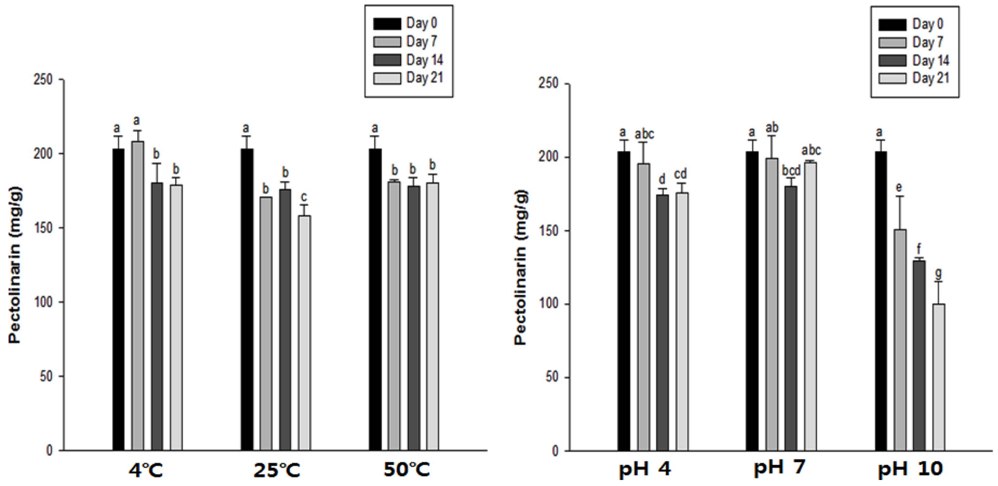

Fig. 1. Changes of pectolinarin content of *C. setidens* Nakai ethanol extract against various temperature (4, 25 and 50°C) and pH (4.0, 7.0 and 10.0). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

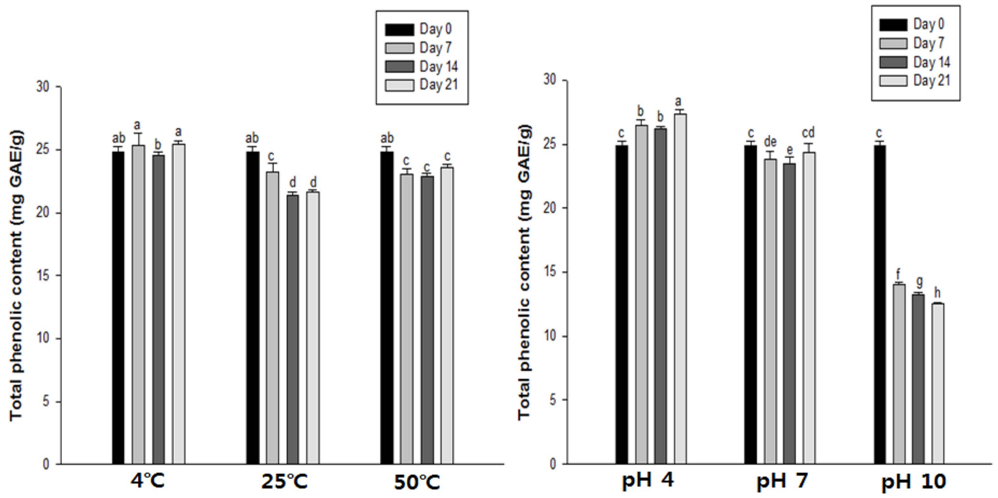

Fig. 2. Changes of total phenol content of *C. setidens* Nakai ethanol extract against various temperature (4, 25 and 50°C) and pH (4.0, 7.0 and 10.0). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

pH 10.0 조건에서 감소치를 보였으며 올리브 잎 추출물에 존재하는 페놀성 화합물들은 산성과 중성 조건에서는 안정하지만 알칼리 조건에서는 매우 불안정하다고 보고한 바 있어 고려엉겅퀴 pectolinarin 성분도 중성조건에서는 안정하고 알칼리 조건에서는 불안정한 것으로 판단되었다. Shim 등[18]에 의하면 포도과피 anthocyanins 색소도 높은 pH(알칼리) 조건에서 anthocyanins 색소가 파괴되고 이러한 현상은 anthocyanins 색소가 안정한 양 ion형으로부터 불안정한 비 ion형으로 되기 때문이라고 보고한 바 있다.

총 페놀 함량 변화

온도(4, 25 및 50ºC) 및 pH(4.0, 7.0, 및 10.0)에 따른 고려엉겅퀴 주정 추출물의 총 페놀 함량에 대한 안정성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저 온도에 대한 영향을 살펴보면, 모든 저장온도에서 저장기간이 길어짐에 따라 총 페놀 함량은 다소 감소하는 경향을 보였다. 이러한 감소치는 저온(4ºC)에서 보다 높은 온도인 25ºC와 50ºC에서 크게 나타났으며, 이는 열에 의한 일부 페놀성 화합물들의 파괴로 인해 총 페놀 함량이 감소하기 때문인 것으로 판단되었다. pH별로는 산성(pH 4.0)과 중성(pH 7.0)에서는 비교적 변화가 적게 나타났으나 pH 10.0에서는 급격한 감소치를 보였다. 이러한 결과는 고려엉겅퀴에 함유된 pectolinarin 함량변화의 결과와도 유사한 것으로 고려엉겅퀴 추출물의 경우 저온(4ºC) 및 중성(pH 7.0)이하의 조건

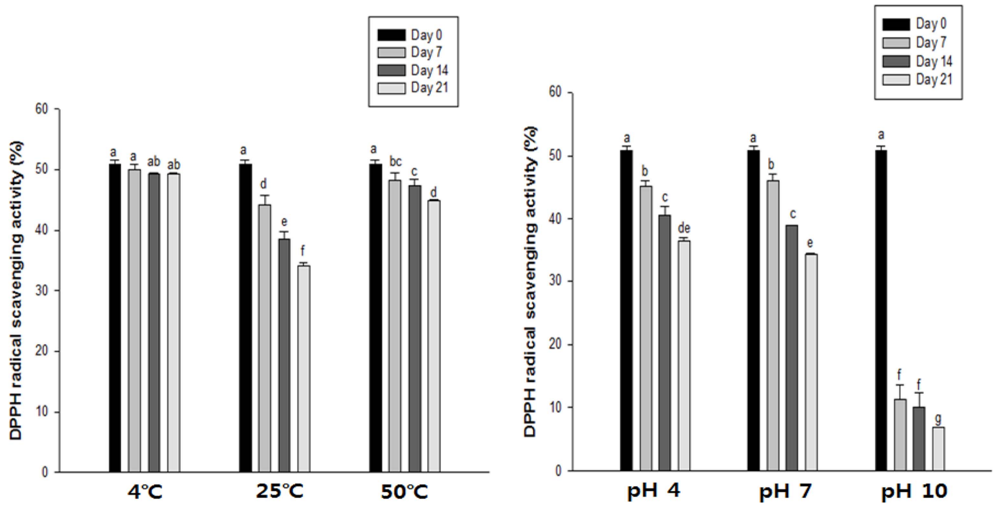

Fig. 3. Changes of DPPH radical scavenging activity of *C. setidens* Nakai ethanol extract against various temperature (4, 25 and 50ºC) and pH (4.0, 7.0 and 10.0). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

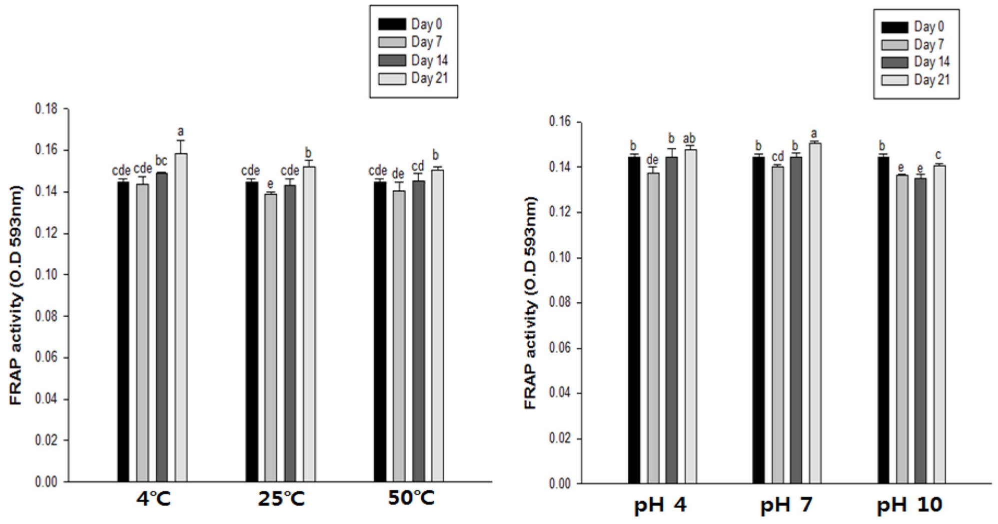

Fig. 4. Changes of FRAP of *C. setidens* Nakai ethanol extract against various temperature (4, 25 and 50ºC) and pH (4.0, 7.0 and 10.0). Results are presented as the mean ± SD of 3 independent in triplicate. Means with different letters on the same kind of bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

에서 저장시 안정하여 유용성분의 파괴를 최소화 할 수 있을 것으로 사료된다. 녹차 catechin 성분의 안정성을 조사한 Park 등[19]의 연구에서도 녹차 catechin은 pH가 낮은 산성 조건에서는 안정하였지만 pH가 높은 알칼리성에서는 매우 불안정하다고 보고하여 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 보였다. 즉, 고려엉겅퀴 pectolinarin과 녹차 catechin은 유사한 구조를 갖고 있어 pH가 높은 알칼리 조건에서는 그 구조가 파괴되는 것으로 사료되었으며 본 연구에서도 산성 및 중성조건에서의 pectolinarin 및 총 페놀 함량의 변화는 다른 조건들에 비해 최소화되어 추출물의 안정성이 높은 것으로 나타났다.

항산화 활성에 대한 안정성 조사

저장조건(온도별 및 pH별)에 따른 고려엉겅퀴 주정 추출물의 항산화 활성의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4와 같다. 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거능(Fig. 3) 및 FRAP assay(Fig. 4)를 이용하여 평가하였고 온도(4, 25 및 50°C) 및 pH(4.0, 7.0, 및 10.0)를 각각 달리하여 21일간 저장하면서 분석하였다. 먼저 고려엉겅퀴 추출물의 초기 DPPH 라디칼 소거능은 50.79 ± 0.75% 이었으나 저장기간이 증가함에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 감소하는 경향을 보였다. 이는 저장조건에 따른 고려엉겅퀴 주정 추출물의 pectolinarin 및 총 페놀 함량에 대한 결과와도 같은 경향으로 DPPH 라디칼 소거능의 변화는 고려엉겅퀴 추출물에 함유된 페놀성 화합물들에 기인한 것으로 판단되었다. DPPH 라디칼 소거능은 페놀성 화합물이나 플라보노이드성 화합물에 함유된 –OH기에서 DPPH 라디칼에 수소(H)를 공여하여 라디칼의 안정화를 통한 탈색되는 원리는 이용하는 방법으로 고려엉겅퀴 주정추출물에 함유된 pectolinarin과 총 페놀 함량의 감소는 DPPH 라디칼 소거능의 변화에 영향을 미친 것으로 사료되었다[20].

한편, FRAP assay의 결과(Fig. 4)는 DPPH 라디칼 소거능의 결과와는 달리 온도별, pH별 저장조건에 따른 큰 변화를 보이지 않았다. DPPH 라디칼 소거능의 결과와 FRAP assay의 결과 값이 다르게 나타난 이유는 두 실험방법간의 차이로 인해 발생한 것으로 사료된다. FRAP assay는 Fe^{3+}가 환원되어 Fe^{2+}로 변환되고 TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazine)와 결합하여 blue 계열의 색을 나타내어 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법이며 DPPH 라디칼 소거능과 같이 항산화 활성을 평가하는 간단한 방법이지만 글루타치온이나 단백질과 같이 –SH(thiols)기를 포함하는 특정 성분의 경우 항산화 활성을 측정하지 못한다는 단점을 가지고 있다[21-23].

이상의 결과를 고려해 볼 때, 고려엉겅퀴 주정 추출물은 산성(pH 4.0)과 중성(pH 7.0)조건에서 저온(4°C) 저장 시 추출물의 안정성을 최적화 할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 많은 연구자들에 의하여 고려엉겅퀴의 다양한 생리활성(항산화 활성, 간 보호 작용, 항염증 활성, 항비만 활성)이 보고[3-5]되고 있으며 본 연구의 결과는 고려엉겅퀴의 건강기능식품 소재로서의 적용 시 기초자료로 활용가능 할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역주력산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

국문요약

본 연구에서는 고려엉겅퀴 추출물에 대한 열안정성, pH 안정성을 조사하고자 고려엉겅퀴 주정추출물은 온도별(4, 25 및 50°C), pH별(4.0, 7.0, 및 10.0)로 저장하면서 추출물의 pectolinarin 함량, 총 페놀 함량, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 및 FRAP assay를 분석하였다. 고려엉겅퀴 추출물의 pectolinarin 함량은 저장기간이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으며, 온도에 의한 영향보다 pH에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다. 총 페놀 함량도 pectolinarin 함량과 저장기간이 증가함에 따라 같이 감소하는 경향을 보였으며 저온(4°C)에서 보다 높은 온도인 25°C와 50°C에서 큰 감소치를 보였고 산성(pH 4.0)과 중성(pH 7.0)에서는 비교적 변화가 적었다. 항산화 활성은 저장기간이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거능은 감소하는 경향을 보였으나 FRAP은 온도별, pH별 저장조건에 따른 큰 변화를 보이지 않았다. 이상의 결과를 고려해 볼 때, 고려엉겅퀴 주정 추출물은 산성(pH 4.0)과 중성(pH 7.0)조건에서 저온(4°C) 저장 시 추출물의 안정성을 최적화 할 수 있을 것으로 판단되었다.

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 O.H., Kim J.H., Kim Y.H., Lee Y.J., Lee J.S., Jo J.H., Kim B.G., Lim J.K., Lee B.Y.: Nutritional components and physiological activities of *Cirsium setidens* Nakai. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **43**, 791-798 (2014).
4. Park H.Y., Kim B.K.: Manufacturing optimization of wet noodle added with leaf powder of freeze-dried *Cirsium setidens* Nakai. *Food Eng. Prog.*, **18**, 130-139 (2014).
5. Kang I.J., Ham S.S., Chung C.K., Lee S.Y., Oh D.H., Cho K.P., Do J.J.: Development of fermented soysauce using *Cir-*

sium setidens Nakai and comfrey. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 1152-1158 (1997).

6. KFDA. Guideline for standard of health functional food. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008).
7. 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).
8. Lee O.H., Lee H.B., Lee J.S., Lee B.Y.: Optimization of extraction condition and stability of olive leaf extract. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **37**, 178-182 (2005).
9. Kim J.M., Cho M.L., Seo K.E., Kim Y.S., Jung T.D., Kim Y.H., Kim D.B., Shin G.H., Oh J.W., Lee J.S., Lee J.H., Kim J.Y., Lee D.W., and Lee O.H.: Effect of Extraction Conditions on *in vitro* Antioxidant Activities of Root Bark Extract from *Ulmus pumila L. J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **44** 1172-1179 (2015).
10. Kim S.J., Kweon D.H., Lee J. H.: Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of Licorice Root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38**, 584-588 (2006).
11. Yoon S.Y., Lee S.Y., Kim K.B.W.R., Song E.J., Lee S.J., Lee C.J., Park N.B., Jung J.Y., Kwak J.H., Nam K.W., Ahn D.H.: Antimicrobial Activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**, 155-159 (2010).
12. 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).
13. Duval B., Shetty K.: The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J. Food Biochem.*, **25**, 361-377 (2001).
14. 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).
15. Biglari F., AlKarkhi A.F., Easa A.M.: Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem.*, **107**, 1636-1641 (2008).
16. Liu S., Zhang J., Li D., Liu W., Luo X., Zhang R., Li L., Zhao J.: Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat. Prod. Res.*, **21**, 915-922 (2007).
17. Liu S., Luo X., Li D., Zhang J., Qiu D., Liu W., She L., Yang Z.: Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *Int. Immunopharmacol.*, **6**, 1387-1393 (2006).
18. Shim K.H., Kang K.S., Choi J.S., Seo K.I., Moon J.S.: Isolation and stability of anthocyanin pigments in grape peels. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.,* **23**, 279-286 (1994).
19. Park Y.H., Won E.K., Son D.J.: Effect of pH on the Stability of Green tea Catechins. *J. Fd. Hyg. Safety*, **17**, 117-123 (2002).
20. 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).
21. Arnao M.B.: Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Tech.*, **11**, 419-421 (2000).
22. Prior R.L., Wu X., Schaich K.: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
23. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K.: 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).