

추출 방법에 따른 삼나무 잎 추출물의 항산화 활성 평가¹

김 선 홍² · 이 수 연⁵ · 조 성 민³ · 홍 창 영⁵ · 박 세 영³ · 박 미 진⁵ · 최 인 규^{2,3,4,†}

Antioxidant Activities of *Cryptomeria japonica* Leaves Extracts by Extraction Methods¹

Seon-Hong Kim² · Su-Yeon Lee⁵ · Seong-Min Cho³ · Chang-Young Hong⁵ ·
Se-Yeong Park³ · Mi-Jin Park⁵ · In-Gyu Choi^{2,3,4,†}

요 약

본 연구는 삼나무 잎 추출물의 항산화 활성을 평가하여 잠재적인 천연 항산화제로의 적용 가능성 구명에 관한 연구이다. 삼나무 잎 추출물은 세 가지 추출방법에 의해 정유, 메탄올 추출물, 열수 추출물로 획득하여 항산화 활성을 평가하였고, 대조구와 비교하여 DPPH radical 소거활성, FRAP 활성, zanthin oxidase 저해활성, 철이온 chelate 활성 평가를 실시하였다. 그 결과, 메탄올 추출물과 열수 추출물의 항산화 활성이 정유의 항산화 활성보다 우수했다. 정유가 함유하고 있는 테르펜 화합물은 항산화 활성이 비교적 낮은 성분으로 사료된다. 활성이 우수했던 메탄올추출물과 열수 추출물은 다양한 유기용매(*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, methanol, ethanol, acetone)와 물을 사용하여 분획을 실시하였고, 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물, 그리고 열수 추출물의 에탄올 분획물이 천연 항산화 성분으로 알려진 α -tocopherol과 유사한 활성을 나타내거나, 보다 우수한 항산화 활성을 나타냈다. 이들은 공통적으로 수산기 및 당류를 가지는 성분을 함유하고 높은 페놀성 화합물 함량을 나타냈기 때문에 삼나무 잎 추출물은 수산기 및 당류를 가지는 페놀성 화합물에 의해 항산화 활성을 나타내는 것이라 판단되었다.

ABSTRACT

This study was to investigate the antioxidant activities of *Cryptomeria japonica* leaves extracts such as essential oil, methanol extract and hot water extract and to evaluate its potential as a natural antioxidant. Antioxidant activities of

¹ Date Received May 26, 2017, Date Accepted June 15, 2017

² 서울대학교 농업생명과학연구원. Research Institute for Agriculture & Life Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

³ 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

⁴ 서울대학교 그린바이오과학기술연구원. Institutes of Green-Bio Science and Technology, Seoul National University, Pyeongchang 25354, Republic of Korea

⁵ 국립산림과학원 임산공학부 화학미생물과. Division of Wood Chemistry & Microbiology, Dept. of Forest Resources Utilization, Korea Forest Research Institute, Seoul 02455, Republic of Korea

[†] 교신저자(Corresponding author): 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

extracts were evaluated by DPPH radical scavenging activity, FRAP activity, zanthin oxidase inhibitory activity, and iron ion chelate activity, comparing with the positive controls.

According to the results, methanol and hot water extracts showed higher antioxidant activities than essential oil. This fact suggested that terpenoids have lower antioxidant effect than phenolic compounds which were found in methanol and hot water extracts. Especially, acetone and water soluble fractions of methanol extract and ethanol fraction of hot water extract contained a lot of phenolic compounds and hydroxyl group, indicating that many hydroxyl groups and glycosidic bonds showed higher antioxidant effect than the other fractions. These results can suggest that the phenolic compounds which contained hydroxyl group or glycosidic bonds have a certain role for effective antioxidant activities.

Keywords : *Cryptomeria japonica*, leaves, extracts, antioxidant activity, phenolic compounds

1. 서 론

인체는 산소와 자외선에 노출됨에 따라 체내에 활성산소를 생성하여 산화 스트레스를 받는다(Park, 2003). 활성산소는 주름생성, 멜라닌 생성 촉진 등의 피부 노화를 가속화하는 주원인으로 알려져 있으며, 체내 항산화효소에 의해 제거된다. 그러나 산소와 자외선의 지속적 노출로 인하여 산화 스트레스에 관한 보호항이 점차 파괴되고, 잔존하는 자유라디칼이 점차적으로 증가함에 따라 생체조직이 손상되고 노화가 촉진된다(Fantone & Ward, 1982). 더 나아가 활성산소의 연쇄반응으로 인한 지질과산화 반응에 의해 생체막 파괴, 효소 불활성, 세포 노화, 동맥경화, 뇌졸중, 암 등의 질병이 유발될 수 있다(Choi *et al.*, 2003). 이에 따라 오늘날, 오존층 파괴 등의 환경오염에 의한 피부 노화를 방지하기 위해 보조식품이나 화장품 등의 항산화제의 사용이 늘고 있다. 하지만 대부분의 항산화제와 항노화 화장품의 원료로서 사용되는 합성 보존료의 위험성에 대한 연구들이 보고됨에 따라 합성 항산화제를 대체할 천연물 유래 항산화제에 대한 관심이 높아지고 있다(Barlow, 1990; Branen, 1975; Ebrahimzadeh *et al.*, 2014).

천연 항산화제로는 동·식물유래 추출물을 예로 들 수 있다. 추출물은 다양한 방향족화합물, 폴리페놀 화합물 등을 함유하고 있기 때문에 항산화 활성이 높다고 보고되었다(Chen *et al.*, 1996, Mira *et al.*, 2002). 다양한 식물 추출물의 항산화 효과에 관한 연구가 보고되고 있지만 수목 잎 추출물에 대한 연구는 부족한 실정이다. 국내 자생 수목 추출물에 대한

연구는 솔잎 추출물과 은행잎 추출물에 대해 보고되고 있으며, 이들은 항산화제로 알려진 α -tocopherol 및 butylated hydroxy anisole (BHA)보다 항산화 활성이 높다고 보고된 바 있다(Hibatallah *et al.*, 1999, Cha *et al.*, 1997).

우리나라의 경우, 숲 가꾸기 사업과 가지치기 등에 의해 많은 수목 잎이 숲에 방치되고 있다. 따라서 미래부에서는 천연물 산업발전 플랫폼 추진을 위해 2015년에 『천연물 소재의 과학화 및 수목 부산물 이용방안 계획』 등을 추진함으로써 수목 부산물의 이용방안을 모색하고 있는 실정이다. 버려지는 수목 잎으로부터 추출물을 획득하고 이들의 항산화 활성을 구명한다면 숲의 부산물로부터 고부가가치 산업이 창출될 수 있을 것이다.

삼나무는 조림 및 방풍림으로 주로 우리나라 남부 지방 및 제주도에 식생하는 수종이다. 하지만 삼나무의 화분 알레르기가 알려짐에 따라 삼나무 벌채 및 이용방안에 관심이 높아짐에 따라 제주도 산림조합에서 삼나무 이용방안 국가 과제를 진행하였고, 아모레퍼시픽에서 삼나무 추출물을 이용한 화장품을 개발하는 등 삼나무를 이용한 사례가 늘고 있다. 삼나무는 추출물 함량이 편백, 잣나무, 소나무보다 높은 수종으로서 이용적 측면에서 삼나무의 가치가 높기 때문에 본 연구에서 공시재료로 사용하였으며, 선행 연구에서 삼나무 잎 유래 다양한 추출물의 항산화 관련 연구는 부족하기 때문에 본 연구를 실시하였다.

추출물은 다양한 추출 방법에 의해 다양한 성분들이 추출될 수 있다. 하지만 동일 시료의 추출 방법에

다른 여러 종류의 추출물의 비교 연구는 부족하다. 따라서 본 연구에서는 삼나무 잎 유래 정유, 유기용매 추출물, 열수 추출물 등의 다양한 추출물의 조성분을 조사하고 각각 항산화 활성을 비교 평가하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 연구에 사용된 삼나무 잎은 제주도 국립산림과학원 난대산림연구소에서 채취하여 생체 상태로 -30℃에서 보관 후, 정유와 열수 추출 시에는 생체 상태, 용매 추출 시에는 24시간 상온에서 건조 후 사용하였다. 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, aluminum nitrate, sodium acetate, potassium acetate, gallic acid, quercetin, catechin, potassium phosphate, xanthine, xanthine oxidase, iron (II) chloride, ferrozine 등은 시그마 알드리치 코리아에서 구입하여 사용하였다. 각각의 시약은 99% 이상의 순도를 나타냈다.

2.2. 추출

정유는 실험실 규모의 수증기 증류 장치에 600 g의 생체 상태의 삼나무 잎과 3 l의 증류수를 첨가하여 추출하였다. 맨틀의 온도를 100℃까지 승온시킨 후, 24시간 동안 증류시켜 휘발성분들을 포집하였다. 응축액의 정유 층만 스포이드로 분리하고 무수황산나트륨을 이용하여 남아 있는 물을 제거한 후, 4℃에서 냉장 보관하였다. 열수 추출물은 정유를 추출할 때 부산물로 나오는 액상을 여과지(Hyundai Micro Co, No.20, 185 mm)로 여과하고 동결 건조하여 획득하였다. 유기용매 추출은 메탄올을 용매로 사용하여 상온에서 침지법으로 24시간 3회 추출 후, 농축 및 동결 건조하여 시료를 준비하였다. 그 후, 열수 추출물과 메탄올 추출물의 분획을 위해 동결 건조 시료에 용매를 첨가하여 분획을 실시하였다. 사용한 용매는 극성의 차이에 따라 선택하였다.

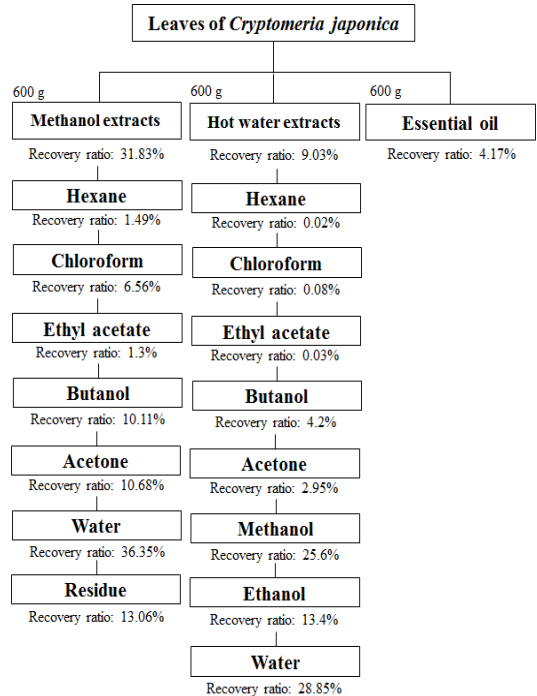


Fig. 1. Flow chart for extraction and solvent fractionation.

n-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, acetone, 물을 순차적으로 200 ml씩 가하여 진탕하여 분획하고 여과 후, 농축 및 동결건조하여 준비하였다. 열수 추출물의 경우, 소수성인 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate에는 활성 평가에 사용할 만큼의 양이 분획되지 않아 시료로 사용하지 않았고, 메탄올과 에탄올을 사용하여 추가로 분획을 실시하였다. 분획 모식도와 회수율은 Fig. 1과 같다. 회수율은 전 건기준이다.

2.3. 항산화 활성평가

2.3.1. DPPH 라디칼 소거활성 평가

DPPH radical 소거능(electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다(Blois, 1958). 각 추출물 당 여러 농도별 시료를 준비하고 시료 1 ml와 1.5×10^{-4} mol/l의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액 1 ml를 혼합하여 10초 간 진탕한

후, 상온에서 30분간 암반응시켜 색변화 관찰을 통해 라디칼 소거활성을 평가하였다. UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하고 다음의 식으로 DPPH 라디칼 소거활성을 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (A / B)] \times 100$$

A: Absorbance of sample

B: Absorbance of blank sample

2.3.2. FRAP (Ferric reducing ability of plasma) 활성 평가

FRAP 활성은 추출물의 환원력 평가로서, 3가 철이온(Fe^{3+})을 2가 철이온(Fe^{2+})으로 환원시키는 능력을 평가하는 방법으로 Benzie and Strain의 방법을 변형하여 측정하였다(Benzie and Strain, 1996). 300 mM의 acetate buffer (pH 3.6)와 40 mM의 염산용액, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)을 혼합한 용액, 20 mM의 염화철(iron (III) chloride, 6수화물)을 부피 비 10 : 1 : 1 비율로 혼합하여 모액(stock solution)으로 준비하여 37°C에 보관하였다. FRAP 반응은 추출물 150 μl 와 모액 2,850 μl 를 혼합한 후, 상온에서 30분 동안 암반응시켜 실시하였다. 그 후, UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 593 nm에서 흡광도를 측정했다. 각각의 흡광도는 Trolox의 표준곡선에 의해 $\mu\text{M TE/g}$ fresh mass로 나타냈다. TE는 trolox equivalent를 의미한다.

2.3.3. Xanthin oxidase 저해활성 평가

Xanthine oxidase (XO) 저해활성은 Marcocci 등의 방법을 변형하여 측정하였다(Marcocci *et al.*, 1994). 기질은 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5))에 xanthine 2 mM을 녹여 제조하였다. XO 저해활성 평가는 제조된 기질 1 mL와 0.04 unit xanthine oxidase 0.1 mL, 5,000 ppm의 삼나무 잎 추출물 0.1 mL를 혼합하여 반응시켰다. 혼합물은 37°C에서 20분간 반응시키고, 그 후 1 N 염산 1 mL를 가하여 반

응을 종료시켰다. 반응액 중에 생성된 uric acid를 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도 292 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 다음 식으로 구하였다.

$$\text{Xanthin oxidase inhibition activity (\%)} = [1 - ((A - B) / C)] \times 100$$

A: Absorbance of group treated enzyme and sample

B: Absorbance of group untreated enzyme

C: Absorbance of blank sample

2.3.4. 철이온 chelate 활성 평가

철이온 chelate 능력 검정법은 Decker 등의 방법을 따랐다(Decker and Welch, 1990). 추출물 1,000 μl 와 증류수 1,350 μl , 2 mM 염화철용액 50 μl 를 혼합한 후, 5 mM ferrozine 용액 100 μl 를 첨가하여 10분 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식을 통해 chelate 활성을 평가하였다.

$$\text{Chelating activity assay (\%)} = [(A - (B - C)) / A] \times 100$$

A: Absorbance of group untreated sample

B: Absorbance of group treated sample and ferrozine

C: Absorbance of group untreated ferrozine

2.3.5. 페놀성 화합물 함량 평가

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법에 따라 평가하였다(Wolfe *et al.*, 2003). 2% Folin-Ciocalteu reagent (수용액, 1 : 10 v/v)에 시료를 혼합한 용액 2 mL에 sodium carbonate (75 g/L) 2 mL를 첨가하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후, UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 gallic acid의 검량선으로 나타냈다. 총 flavonol 함량은 Kumaran 등의 방법에 따랐다(Kumaran & Karunakaran, 2007). 2 mL의 시료와 2 mL의 2% 알루미늄 질산염, 3 mL의 아세트산나트륨(50 g/L)을 25°C에서 150분간 반응 후, UV-Visible

spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하여 quercetin의 검량선으로 나타냈다.

2.4. 성분 분석

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)와 gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS)를 이용하여 성분 분석을 실시하였다.

FTIR (JASCO. FTIR-6100 AVANCE 600)은 파장 범위 4,000~400 cm^{-1} 에서 32 scans/ cm^{-1} 으로 분석하였다.

GC-MS를 위해서 TMS (Trimethylsilylation) 반응을 실시하였다. TMS는 무수 pyridine (JUNSEI, Japan)과 Sylon BFT 용액(BSTFA + TMCS (99:1), SUPELCO)을 1:1의 비율로 시료에 첨가하여 105°C에서 2시간 반응시켜 실시하였다. TMS 반응을 시킨 시료는 GC (model-Agilent 6890) 분석을 위해 DB-5 (25 m × 0.32 mm × 0.52 μm) column을 사용하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였고, 온도 조건은 injector 260°C, detector 280°C였다. Oven 온도는 초기온도 50°C에서 5분간 유지한 후 3°C/min의 속도로 온도를 상승시키고 최종온도 320°C에서 5분간 유지하여 분석하였다. MS 분석은 model Agilent 5973을 사용하였고 EI mode로 분석하여 얻어진 시료 피크의 mass data와 표준 library data (Willy 7th ed)를 비교하여 피크의 화합물 구조를 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 활성

3.1.1. DPPH 라디칼 소거활성 평가

삼나무 잎 정유, 메탄올 추출물, 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 결과는 Figs. 2, 3, 4와 같다. 삼나무 잎 정유의 DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과 (Fig. 2), 반응시간을 30분, 1시간, 2시간 및 4시간으로 차이를 두어 실험을 실시하였다. 그 결과, 30분 반응했을 때, 6,400 ppm의 농도까지 활성이 10% 미만으로 매우 미미했다. 하지만 1시간, 2시간 및 4시

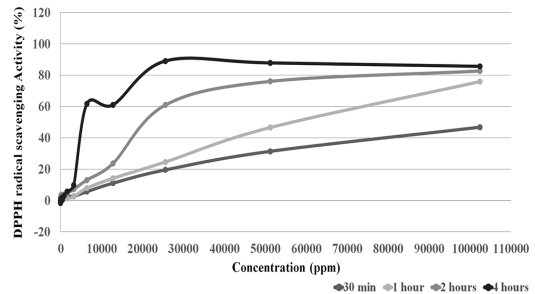


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities (%) of essential oil from *Cryptomeria japonica* leaves.

간으로 반응시간을 증가시켰을 때, 그 활성 또한 증가했으며, 실험은 공기, 온도, 빛 등의 외부적 환경을 고려하여 진행하였다. 선행 연구들에 따르면 정유를 구성하고 있는 테르펜은 구조가 다양하며 많은 성분을 함유하고 있기 때문에 각각의 성분들은 각기 다른 kinetic behaviour의 라디칼 소거 능력을 가질 것이며(Kulisic *et al.*, 2004), 이러한 여러 반응 메커니즘의 영향으로 반응이 천천히 일어날 것이라고 보고된 바 있다(Koleva *et al.*, 2002). 마찬가지로 본 연구에서 반응시간의 증가에 따라 활성은 증가했지만 6,400 ppm 미만의 농도에서는 10% 미만의 매우 낮은 활성을 나타냈으므로 정유의 항산화 유효성을 판단하기 어렵다. 천연 항산화제의 원료로 이용되는 α -tocopherol, catechin, gallic acid 및 quercetin은 62.5 ppm에서 100%에 가까운 활성을 나타냈기 때문에 삼나무 정유는 항산화 활성이 매우 낮은 것으로 사료된다(Fig. 4).

Fig. 3은 메탄올 추출물과 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과이다. 두 추출물은 유사한 활성을 나타냈다. 메탄올 추출물과 열수 추출물의 IC50은 약 40 ppm에서 나타났다. 두 추출물 모두 31.25 ppm에서 40% 이상의 활성을 나타냈고 62.5 ppm 이상에서는 메탄올 추출물은 74.3%, 열수 추출물은 87.3%로 높은 활성을 나타냈다. 125 ppm에서는 각각 94.4%, 93.9%로 매우 높은 활성을 나타냈다. 특히, 메탄올 추출물과 열수 추출물은 62.5 ppm 이상의 농도에서 대조군으로 사용된 α -tocopherol과 유사한 활성을 나타냈다. 낮은 농도에서도 높은 활성

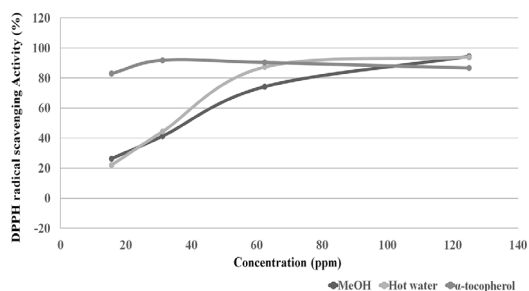


Fig. 3. DPPH radical scavenging activities (%) of α -tocopherol (positive control), methanol and hot water extracts from *Cryptomeria japonica* leaves.

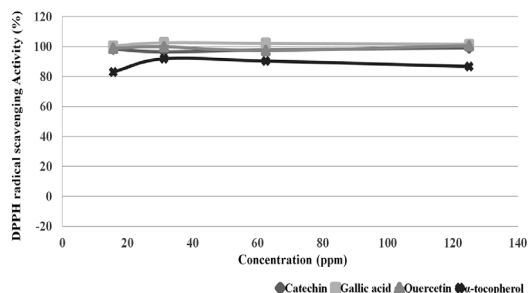


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities (%) of positive controls such as catechin, gallic acid, quercetin, and α -tocopherol.

을 나타낸 catechin, gallic acid 및 quercetin보다 낮은 활성을 보였지만 125 ppm의 낮은 농도에서 100%에 가까운 활성을 나타냈기 때문에 삼나무 잎 메탄올 추출물과 열수 추출물은 항산화 유효성이 있다고 판단된다.

삼나무 정유의 DPPH 라디칼 소거활성은 매우 미미하기 때문에 세 가지 추출물 중 정유를 제외한 메탄올 추출물, 열수 추출물의 유기용매 분획을 통해 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 평가하였다. 열수 추출물은 수용성 추출물로서 극성이 낮은 *n*-hexane, chloroform과 ethyl acetate 용매에는 활성을 평가할 양이 추출되지 않아 시료로 사용하지 않았다. 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과는 Fig. 5 및 6과 같다. 메탄올 추출물에서는 acetone과 물 분획물이 IC50 값을 약 15 ppm으로 나타내며 가장 라디칼 소거활성이 우수했고, 반면 *n*-hexane, chloro-

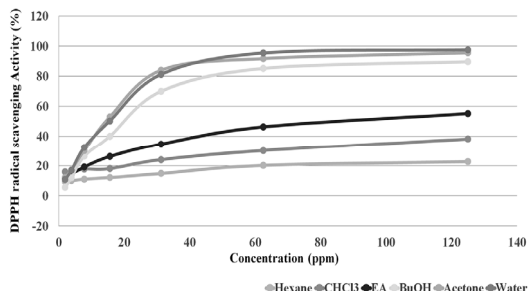


Fig. 5. DPPH radical scavenging activities (%) of solvent fractions of methanol extract. CHCl₃: chloroform, EA: ethyl acetate, BuOH: butyl alcohol.

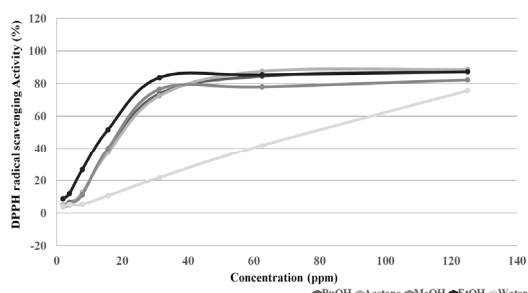


Fig. 6. DPPH radical scavenging activities (%) of solvent fractions of hot water extract. BuOH: butyl alcohol, MeOH: methanol, EtOH: ethanol.

form 및 ethyl acetate 분획물은 미비했다. 특히 acetone 분획물과 물 분획물은 15.6 ppm에서 50% 이상의 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 31.3 ppm에서 각각 83.9%, 81.2%의 높은 활성을 나타냈다. 열수 추출물의 경우, 에탄올 분획물에서 IC50 값을 약 13 ppm을 나타내며 가장 우수한 활성을 나타냈고, 물 분획물을 제외한 나머지 분획물 모두 활성이 우수했다. 에탄올 분획물은 31.3 ppm에서 83.7%의 높은 라디칼 소거활성을 나타냈다. 메탄올 추출물의 물 분획물은 활성이 높았지만 열수 추출물의 물 분획물은 활성이 매우 미미하였다. 같은 용매로 분획을 하였어도 조추출물을 획득할 때의 추출 방법에 따라 추출되는 성분이 다르기 때문에 분획물의 구성 성분이 다르게 되어 활성에 차이를 나타내는 것이라 사료된다(Lapornik *et al.*, 2005; Pinelo *et al.*, 2005).

Jung 등(2012)에 따르면, 소테나무 잎의 메탄올 추

추출 방법에 따른 삼나무 잎 추출물의 항산화 활성 평가

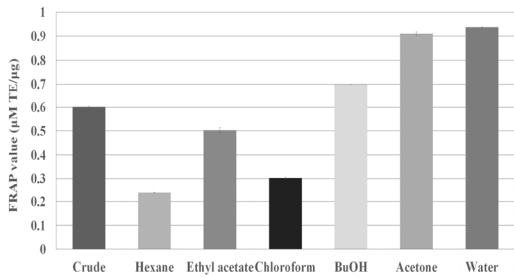


Fig. 7a. FRAP values (µM TE/µg) of methanol extract and its solvent fractions (5,000 ppm concentration).

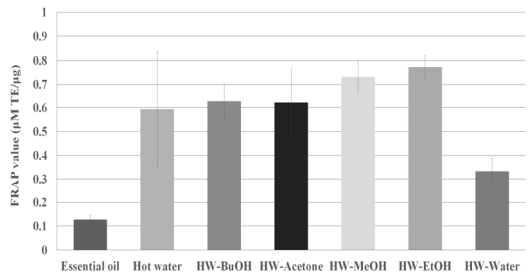


Fig. 7b. FRAP values (µM TE/µg) of essential oil, hot water extract and solvent fractions of hot water extract (5,000 ppm concentration). HW: Hot water extract.

출물은 10 ppm의 농도에서 97% 이상의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다고 보고되었다. 하지만 Jung 등의 연구는 본 연구와 DPPH 용액의 농도는 같지만 시료 추출물을 DPPH 용액의 4배가 되도록 첨가하여 실험한 것으로서, 최종 시료의 농도가 높기 때문에 본 연구결과와 차이가 있는 것으로 사료된다. 유사한 방법으로 실험을 실시한 Jimoh 등(2007)의 연구에 따르면 *Paullinia pinnata*의 메탄올 추출물은 40 ppm의 농도에서 90%의 높은 활성을 나타냈으며 이는 합성항산화제인 BHA와 유사한 활성이라고 보고한 바 있다. *P. pinnata*의 메탄올 추출물의 결과와 삼나무 잎 추출물의 결과가 유사하므로 삼나무 잎 추출물은 항산화 유효 천연물로 판단된다.

메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물은 조추출물보다 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과에 따라, 메탄올 조추출물을 acetone으로 분획하거나 열수 추출물을 에탄올로 분획하는 것이 삼나무 잎으로부터 높은 항산화 활성을 나타내는 분획물을 얻을 수 있는 최적 추출 방법이라 사료된다.

3.1.2. FRAP (Ferric reducing ability of plasma) 활성 평가

삼나무 잎 추출물의 항산화 능력을 검정하기 위해 FRAP 활성 평가를 통해 환원력 평가를 실시하였다. FRAP 활성은 Trolox 환원력에 대한 흡광도의 검량선($R^2 = 0.96$)으로 수식($y = 0.045x + 0.0145$)을 얻었

고, 이를 통해 당량농도(Equivalent concentration)로 나타냈다. 그 결과, FRAP 활성은 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 결과를 나타냈다.

Fig. 7a는 메탄올 추출물과 그 분획물의 FRAP 활성 평가 결과이다. Acetone 분획물과 물 분획물이 조추출물보다 높은 활성을 나타냈고 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate는 조추출물보다 낮은 활성을 나타내며 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 결과를 나타냈다. 메탄올 추출물은 0.6 µM TE/µg의 활성을 나타냈고, 물 분획물은 0.94 µM TE/µg으로 가장 높은 활성을 나타냈으며, acetone 추출물 또한 0.91 µM TE/µg으로 높게 나타났다.

Fig. 7b는 정유, 열수 추출물 및 열수 추출물의 용매분획물의 FRAP 활성 평가 결과이다. 정유는 0.13 µM TE/µg의 낮은 활성을 나타냈고, 열수 추출물과 그 분획물들은 물 분획물을 제외하고 모두 높은 FRAP 활성을 나타냈다. 특히, 열수 추출물의 에탄올 분획물은 0.77 µM TE/µg으로 가장 높은 활성을 나타냈다. 열수 추출물은 조추출물 자체가 0.59 µM TE/µg의 FRAP 활성을 나타내며 높은 항산화 효과를 나타냈다.

Tachakittirungrod 등(2007)에 따르면 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT)이 2.92 µM TE/µg 나타냈다고 보고하였고, Dudonné 등(2009)에 따르면 허브, 수목, 과일 등의 30종의 식물 추출물의 FRAP 활성은 1 µM TE/µg 미만으로 나타났다. 이는 BHT와 같은 합성 항산화제에 비해 식물 추출물

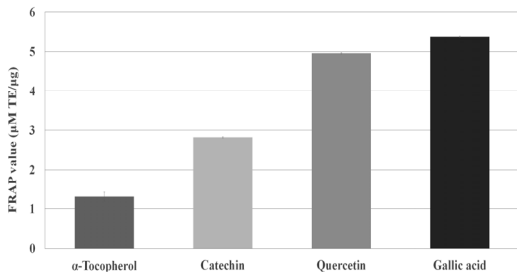


Fig. 8. FRAP values ($\mu\text{M TE}/\mu\text{g}$) of positive control such as catechin, gallic acid, quercetin and α -tocopherol.

이 낮은 항산화 활성을 나타내지만 BHT의 인체에 미치는 부작용을 대비하기 위한 대체제로 식물 추출물의 가능성을 평가한 결과이다. 이러한 결과와 비교하였을 때, 항산화 활성을 가지는 식물 추출물에 비해 삼나무 잎 추출물의 FRAP 활성이 높았기 때문에 삼나무 잎 추출물의 항산화 유효성이 높다고 판단된다. 따라서 삼나무 잎 메탄올 및 열수 추출물은 천연 항산화 추출물로의 적용이 가능하다고 사료된다.

Fig. 8은 대조군으로 이용한 항산화 성분인 α -tocopherol, catechin, quercetin, gallic acid의 결과이다. 모든 추출물보다 대조군의 FRAP 활성이 높았다. 하지만 α -tocopherol은 가장 널리 이용되는 천연 항산화제로서 삼나무 잎 추출물들의 활성과 유사했기 때문에 본 연구를 통해 삼나무 잎 추출물의 높은 항산화 활성을 구명하였다고 판단된다. 또한 선행 연구들의 결과를 토대로, 다양한 식물 추출물에 비해 삼나무 잎 추출물의 메탄올 추출물과 열수 추출물이 높은 환원력을 나타냈기 때문에 삼나무 잎 추출물은 천연 항산화제로 적용이 가능할 것이라 사료된다. 또한 본 연구를 통해 삼나무 잎의 메탄올 및 열수 추출물의 유효 분획물을 획득할 수 있는 최적 분획법을 제시하였다고 판단된다.

3.1.3. Xanthine oxidase 저해활성 및 철이온 chelate 활성 평가

Xanthine oxidase (XO)는 산화효소로서 과산화 양이온을 생성하고 생체 조직의 산화 손상을 일으키는 효소이다(Chambers *et al.*, 1985). 본 연구에서는 산

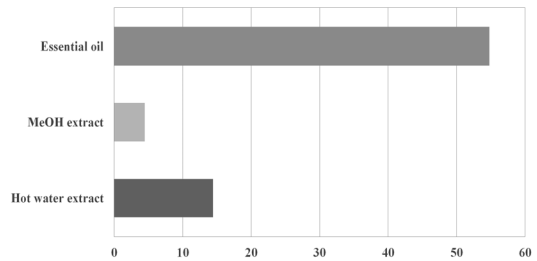


Fig. 9. Xanthine oxidase inhibition activities (%) of *Cryptomeria japonica* leaves extracts.

화효소 억제효능을 알아보고자 XO 저해활성을 평가하였다. 또한 혈액 속 단백질과 결합하지 않은 철, 구리 이온의 제거를 통해 일어나는 항산화 활성을 관찰하고자 철이온과의 chelate 활성 평가를 실시하였다(Mira *et al.*, 2002). XO 저해활성과 철이온 chelate 활성 평가는 라디칼 소거활성, 환원력 평가와 같은 농도로 평가를 실시하였으나 활성을 나타내지 않아 5,000 ppm의 농도로 평가를 실시하였다.

XO 저해활성 평가 결과는 Fig. 9와 같다. 앞선 라디칼 소거활성과 환원력 평가와는 상이한 결과가 나타났다. 정유가 메탄올 추출물과 열수 추출물보다 높은 XO 저해활성을 나타냈다. 정유는 54.8%의 XO 저해활성을 나타냈고, 열수 추출물과 메탄올 추출물은 각각 14.4%, 4.5%의 XO 저해활성을 나타냈다. 정유의 XO 저해활성이 메탄올 및 열수 추출물보다 높은 이유는 정유에 의해 산화효소인 XO가 저해되었기 때문으로 사료된다. Kwon 등(2012)에 따르면 주박의 열수 및 에탄올추출물이 XO 저해 효과가 미미하다고 보고된 바 있기 때문에 천연물이 높은 항산화 활성을 나타내더라도 산화효소 억제에는 미미할 수 있다고 판단된다. Nagao 등(1999)은 다양한 플라보노이드 화합물의 XO 저해 효과에 대해 평가하였고, chrysin, luteolin, kaemferol, quercetin, myricetin과 같은 flavonol과 flavone 화합물이 XO 저해활성을 나타냈다고 보고하였다. 하지만 삼나무 잎 추출물은 높은 농도에서 XO를 억제하므로 산화효소 억제 외의 다른 기작으로 항산화 활성을 나타낸다고 사료된다.

철이온 chelate 활성 평가 결과는 Fig. 10과 같다. 각각의 추출물은 5,000 ppm의 농도로 실험이 이루어

Table 1. Polyphenol contents of methanol extract and its solvent fractions

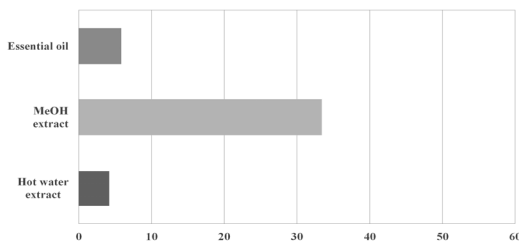
	Crude extract	Solvent extracts					
		Hexane	Chloroform	EA	BuOH	Acetone	Water
Total phenol contents	9.21 ± 0.26	10.13 ± 0.62	7.34 ± 0.22	7.29 ± 0.52	9.86 ± 0.01	12.86 ± 0.22	11.83 ± 0.11
Total flavonol contents	6.86 ± 0.01	8.37 ± 0.00	8.88 ± 0.05	9.89 ± 0.05	7.81 ± 0.00	7.58 ± 0.01	5.85 ± 0.00

EA: ethyl acetate, BuOH: butanol

Table 2. Polyphenol contents of hot water extract and its solvent fractions

	Crude extract	Solvent extracts				
		BuOH	Acetone	MeOH	EtOH	Water
Total phenol contents	25.95 ± 0.07	24.31 ± 0.09	24.53 ± 0.15	24.87 ± 0.14	29.5 ± 0.14	16.74 ± 0.01
Total flavonol contents	2.29 ± 0.11	2.39 ± 0.19	2.35 ± 0.06	1.81 ± 0.12	3.79 ± 0.40	0.23 ± 0.03

BuOH: butanol, MeOH: methanol, EtOH: ethanol

**Fig. 10.** Ferrous ion chelate activities (%) of *Cryptomeria japonica* leaves extracts.

졌으며, 정유와 열수 추출물의 chelate 활성은 각각 5.8%, 4.2%로 낮았고, 메탄올 추출물은 33.4%로 정유와 열수 추출물에 비해 높은 활성을 나타냈다. 하지만 삼나무 잎 추출물의 chelate 활성 또한 XO 저해활성과 마찬가지로 라디칼 소거활성과 환원력에 비해 높지 않았다. Wang 등(2009)에 따르면 해초의 수용성 추출물은 5,000 ppm의 농도에서 60% 이상의 활성을 나타냈다고 보고된 바 있으며, Packer 등에 따르면 소나무과의 *Pinus maritima* 수피 유래 플라보노이드가 chelate 반응이 높다고 보고된 바 있다. 또한 갈조류 추출물은 높은 금속 chelate 반응을 한다고 보고되었다(Chew *et al.*, 2008; Packer *et al.*, 1999; Senevirathne *et al.*, 2006). 이러한 금속 chelate 반응은 폴리페놀 구조의 수산기에 의해 일어난다고 보고되었다(Santoso *et al.*, 2004). 따라서 삼나무 잎

추출물 중 메탄올 추출물이 정유, 열수 추출물보다 chelate 반응을 일으키는 수산기가 비교적 많이 존재할 것이라고 판단된다.

삼나무 잎 추출물의 산화효소 억제 활성과 금속 chelate 활성은 높은 농도에서 나타났다. 따라서 유기용매별 분획물에 대한 실험은 실시하지 않았다. 삼나무 잎 추출물은 산화효소 억제 및 금속 chelate 반응보다 라디칼 소거활성과 환원력이 뛰어났다. 생체 내의 주요 산화 스트레스는 ROS에 의한 것이기 때문에 라디칼 제거 효과 및 환원력이 중요하므로 삼나무 잎의 메탄올 및 열수 추출물은 효과적인 천연 항산화 원료로 사료된다.

3.2. 페놀성 화합물 함량 평가

대부분의 천연물은 페놀성 화합물과 플라보노이드를 함유하고 있어 높은 항산화 활성을 가진다고 보고되고 있다(Ferguson, 2001). 따라서 추출물의 페놀 및 flavonol과 같은 페놀성 화합물 함량을 평가함으로써 항산화 활성과 비교하고자 하였다.

라디칼 소거활성과 환원력이 높았던 메탄올 추출물과 열수 추출물의 페놀성 화합물 함량 평가를 실시하였다. 총 페놀 함량과 총 flavonol 함량을 측정된 결과는 Table 1 및 2와 같다.

총 페놀 함량은 페놀성 화합물 및 플라보노이드

구조를 가진 성분들의 함량을 의미한다. 메탄올 추출물은 열수 추출물에 비해 총 페놀 함량이 낮았다. 총 페놀 함량이 9.21%인 메탄올 추출물보다 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물이 각각 12.86%, 11.83%로 높게 나타났다. 메탄올 추출물의 ethyl acetate와 chloroform 분획물은 7.34%, 7.29%로 메탄올 추출물보다 낮은 페놀 함량을 나타냈다. 열수 추출물은 물 분획물을 제외하고 모두 24% 이상의 높은 페놀 함량을 나타냈다.

Flavonol 함량 측정 결과, 메탄올 추출물 분획물의 경우, 물 분획물 이외의 다른 분획물이 메탄올 추출물보다 flavonol 함량이 높았다. 열수 추출물과 열수 추출물 분획물의 경우, 메탄올 추출물보다 낮은 flavonol 함량을 나타냈지만 열수 추출물의 에탄올 분획물은 비교적 높은 flavonol 함량을 나타냈다. Flavonol 구조 또한 페놀 구조를 가진 성분으로서 비교적 flavonol 함량보다 총 페놀 함량이 높았던 열수 추출물은 flavonol 구조 이외의 다른 페놀성 화합물이 많이 함유하고 있는 것으로 사료된다. 메탄올 추출물의 경우, flavonol 함량이 총 페놀 함량 보다 높았기 때문에 페놀성 화합물 중 flavonol 구조가 많이 함유되어 있는 것으로 판단된다.

항산화 활성 결과와 비교해 보면, 가장 우수했던 메탄올 추출물의 acetone, 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물은 페놀성 화합물의 함량이 높게 측정되었다. 세 가지 분획물의 총 페놀 함량 중, 열수 추출물의 에탄올 분획물이 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물보다 2배 이상 높게 나타났다. 따라서 열수 추출물이 메탄올 추출물보다 다소 높은 항산화 활성을 나타낸 이유는 페놀 함량이 높기 때문으로 사료된다.

종합적으로, 가장 항산화 활성이 높았던 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물은 공통적으로 높은 페놀 함량으로 인해 효과적인 항산화 활성을 나타낸 것으로 판단된다. 메탄올 추출물에는 플라보노이드 구조를 가진 페놀성 화합물이 주성분으로 함유되어 있고, 열수 추출물에는 플라보노이드 외 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있기 때문에 항산화 효과를 나타내는 것이라 사료된다.

많은 선행 연구에서 페놀성 화합물과 항산화 활성과의 연관성에 대해 언급하였다. 특히, 식물 추출

물의 높은 항산화 활성을 페놀성 화합물의 함량이 많기 때문이라 보고되었다(Velioglu *et al.*, 1998, Scalzo *et al.*, 2005, Jimoh *et al.*, 2007). Velioglu 등 (1998)에 따르면, 28종의 식용 작물의 총 페놀 함량과 항산화 활성을 비교한 결과 높은 연관성이 있다고 보고하였다. 선행연구를 바탕으로 본 연구의 결과를 고찰한 결과, 삼나무 잎 추출물의 높은 항산화 활성은 페놀 구조에 의한 것이라 사료된다.

3.3. 성분 분석

3.3.1. FTIR 분석

본 연구의 페놀성 화합물 함량 평가 결과에 따라 항산화 활성에 대한 수산기의 영향이 관찰되었다. 이에 따라 FTIR 분석을 통한 추출물의 관능기를 관찰하였다(Fig. 11 및 12). 모든 추출물에서 2,800~3,000 cm^{-1} 의 C-H 구조와 1,700~1,600 cm^{-1} 의 carbonyl group (C=O), 1,500~1,400 cm^{-1} 의 3개의 방향족 탄소 이중결합(방향족 C=C)이 나타났다. 항산화 활성이 높았던 메탄올 추출물의 acetone, 물 분획물에서 3,300~3,200 cm^{-1} 의 수산기(O-H) 피크와 1,100~1,010 cm^{-1} 에서 뚜렷한 당류의 C-O 결합 또는 수산기와 결합된 탄소가 관찰되었다. 열수 추출물에서는 물 분획물을 제외한 나머지 분획물에서 수산기와 당류의 C-O 결합이 모두 관찰되었다. 또한 활성이 낮았던 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서는 수산기와 당류가 거의 관찰되지 않았다. 이들은 다른 분획물 보다 페놀 화합물 함량이 낮았기 때문에 수산기와 당류가 관찰되지 않은 것으로 사료되며, 이는 수산기와 당 성분이 항산화 활성에 큰 영향을 미친다는 것으로 예상할 수 있다. 따라서 삼나무 잎 추출물 유래 항산화 유효성분은 수산기가 많이 함유되어 있는 방향족이면서 당을 포함한 성분으로 예상된다. 수피 및 식물 잎 유래 유기용매 및 열수 추출물에서 본 연구와 같이 수산기와 방향족 탄소 이중결합, 다당류를 포함한 추출 성분들이 관찰된 바 있다(Sivam *et al.*, 2013; Zarai *et al.*, 2013).

추출 방법에 따른 삼나무 잎 추출물의 항산화 활성 평가

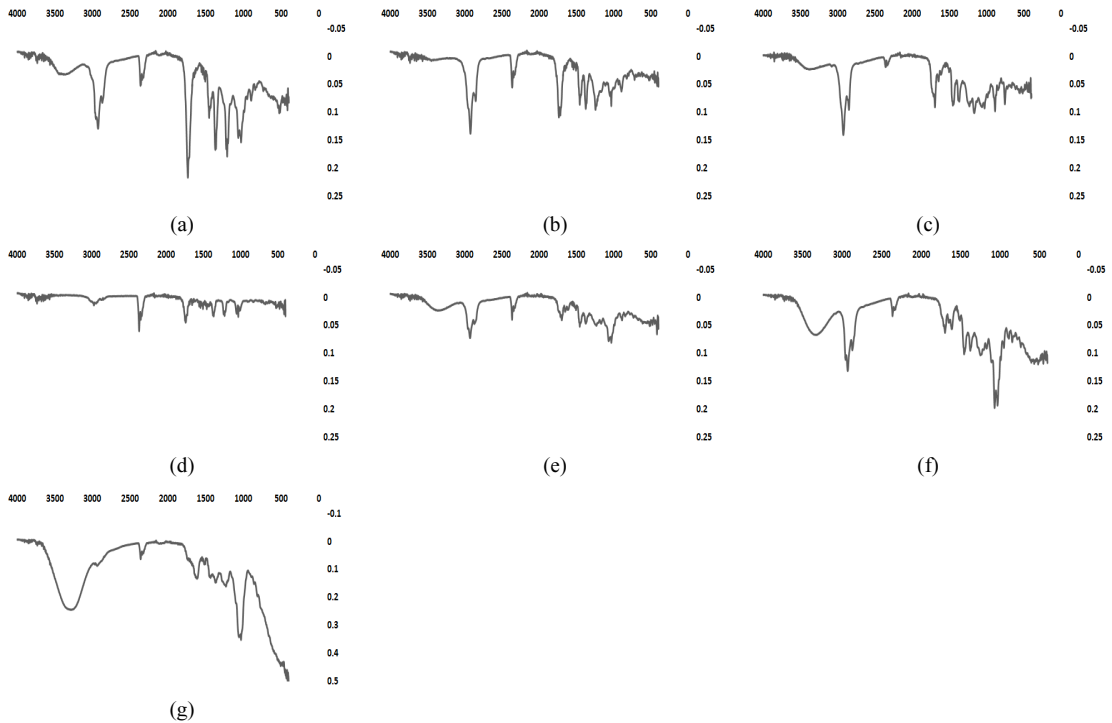


Fig. 11. FTIR spectra of methanol extract and its solvent fractions. (a): Crude extract, (b): Hexane fraction, (c): Chloroform fraction, (d): Ethyl acetate fraction, (e): Butyl alcohol fraction, (f): Acetone fraction, (g): Water fraction.

* X-axis: cm^{-1} , Y-axis: absorbance

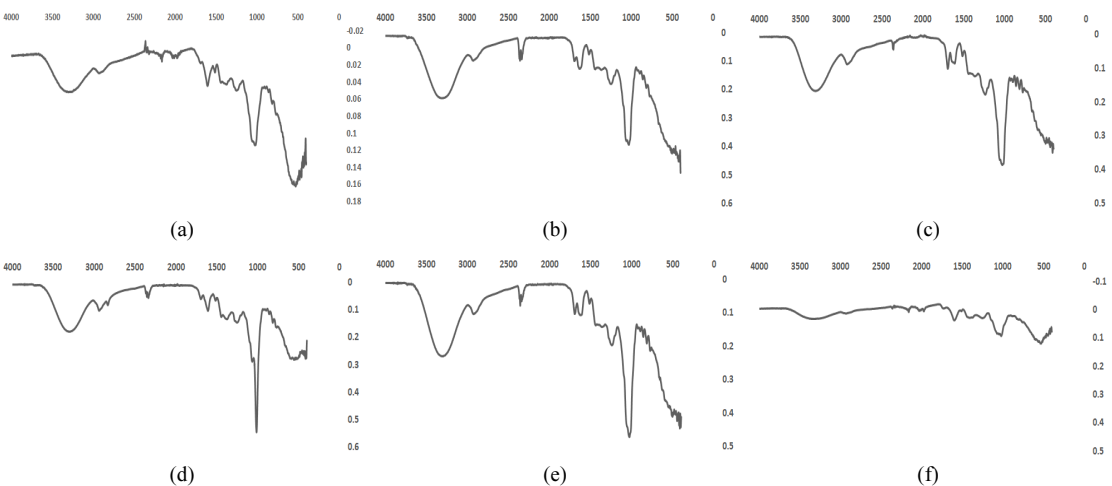


Fig. 12. FTIR spectra of hot water extract and its solvent fractions. (a): Crude extract, (b): Butyl alcohol fraction, (c): Acetone fraction, (d): methanol fraction, (e): ethanol fraction, (f): Water fraction.

* X-axis: cm^{-1} , Y-axis: absorbance

Table 3. GC-MS analyses of methanol extract and its solvent fractions

Crude extract	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butyl alcohol	Acetone	Water
Kaurene	Kaurene	Kaurene	Shikimic acid	Shikimic acid	Shikimic acid	D-Pinitol
Shikimic acid	β -Eudesmol	Elemol		D-Pinitol	D-Pinitol	Glucopyranose
D-Pinitol	Pimaric acid	β -Eudesmol		Mannopyranose	Fructopyranose	Shikimic acid
Fructopyranose	Androstane	α -Eudesmol		Tagatofuranose	Mannopyranose	Fructopyranose
(+) Copalol	Isopimaric acid			Xylofuranose	Glucopyranose	
β -Eudesmol				Glucopyranose	Pimaric acid	
Elemol					Isopimaric acid	
α -Eudesmol						
Galatopyranose						
Glucopyranose						
Androstane						
Sclareol						
Pimaric acid						
Isopimaric acid						

Table 4. GC-MS analyses of hot water extract and its solvent fractions

Crude extract	Butyl alcohol	Acetone	Methanol	Ethanol	Water
Shikimic acid	Shikimic acid	Shikimic acid	Shikimic acid	Shikimic acid	Shikimic acid
Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose	Glucopyranose
Fructopyranose	Fructopyranose	Fructopyranose	Fructopyranose	Fructopyranose	Fructopyranose
D-Pinitol	D-Pinitol	D-Pinitol	D-Pinitol	D-Pinitol	D-Pinitol
Mannopyranose	Mannopyranose	Mannopyranose	Mannopyranose	Mannopyranose	Mannopyranose
Chlorogenic acid	Catechin	Catechin	Chlorogenic acid	Chlorogenic acid	Chlorogenic acid
Catechin		Arabinopyranose		Catechin	Isopimaric acid

3.3.2. GC-MS 분석

성분 분석을 위해 GC-MS 분석을 실시하였다. 그 결과는 Table 3, 4와 같다. 그 결과, 메탄올 추출물은 테르펜 화합물과 당 성분이 검출되었으며, 향산화 활성이 낮았던 *n*-hexane과 chloroform 분획물에서는 주로 테르펜 화합물이 검출되었다. 검출된 테르펜 화합물은 삼나무 정유의 주성분인 kaurene, elemol, eudesmol 및 terpineol 등이었다(Kim *et al.*, 2013). 이는 메탄올 추출물의 테르펜 화합물이 비교적 비극성 용매인 *n*-hexane이나 chloroform 분획에 포함된 것으로 보인다. 이와 같이 *n*-hexane과 chloroform 분획물의 낮은 향산화 활성의 결과는 삼나무 정유의 낮은

향산화 활성과 연관 지을 수 있으며, 테르펜 화합물의 미미한 향산화 효과 때문에 메탄올 추출물의 *n*-hexane, chloroform 분획물이 낮은 향산화 활성을 나타낸 것이라 사료된다. 활성이 높았던 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물에서는 당 성분이 주로 검출되었다. 이는 TMS화 과정에서 열에 의해 플라보노이드 배당체의 결합이 깨지면서 당 성분이 주로 검출된 것이라 사료된다. Stobiecki (2000)에 따르면 플라보노이드 배당체 MS 분석 시, 플라보노이드 배당체의 O-glycosylation bond가 해리되어 당류의 검출이 이루어진다고 보고하였기에 같은 결과로 판단된다.

열수 추출물의 경우 모든 분획물에서 비슷한 성분

이 검출되었으며, 메탄올 추출물과 마찬가지로 여러 당 성분이 검출되었다. 이 또한 TMS화에 의해 플라보노이드 배당체의 결합이 해리되면서 당 성분이 검출된 것으로 사료된다. 하지만 메탄올 추출물과 다르게 열수 추출물에서는 catechin과 chlorogenic acid가 주성분으로 검출되었다. Catechin과 chlorogenic acid는 항산화 활성 성분으로 알려져 있으므로 열수 추출물의 에탄올 분획물의 항산화 활성이 높은 것은 이러한 성분들에 기인된 것으로 판단된다.

다양한 식물 추출물 유래 chlorogenic acid의 항산화 유효성에 관한 연구가 많이 이루어졌다(Bouayed *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 1999; Kweon *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2011). 그러나 지금까지 삼나무 잎 추출물에서 chlorogenic acid가 검출되었음을 보고한 연구는 없었고 본 연구에서 삼나무 잎 추출물의 항산화 유효성분으로 chlorogenic acid를 처음으로 구명하였다고 판단된다.

4. 결 론

삼나무 잎 추출물의 항산화제로서의 적용 가능성을 평가하고자 세 가지 추출 방법을 통해 추출된 정유, 메탄올 추출물, 열수 추출물의 항산화 활성을 비교 평가하였다. 그 결과, 정유에 비해 메탄올 추출물과 열수 추출물이 뛰어난 항산화 활성을 나타냈다. DPPH 라디칼 소거활성 평가 결과, 메탄올 추출물과 열수 추출물은 62.5 ppm 농도에서 70% 이상의 높은 활성을 나타냈다. 또한 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물은 15.6 ppm 농도에서 50% 이상의 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 31.3 ppm에서는 80% 이상의 높은 라디칼 소거활성을 나타내며 메탄올 및 열수 추출물보다 높은 활성을 나타냈다. FRAP 활성 평가 결과, DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물이 뛰어난 활성을 나타냈다. 따라서 삼나무 잎의 항산화 원료로의 적용을 위해서는 메탄올 및 열수 추출이 최적 추출방법이라 판단된다. 삼나무 잎 추출물의 산화효소 억제 활성과 금속 chelate 활성은 농

도 의존적으로 활성을 나타내기는 하나, 매우 높은 농도에서 활성을 나타냈다. 산화효소 억제 활성과 금속 chelate 활성은 라디칼 소거활성과 환원력 평가에 비해 미미한 결과를 나타냈다. 따라서 삼나무 잎 추출물의 항산화 효과는 높은 라디칼 소거활성과 높은 환원력을 통해 나타난다고 판단된다.

삼나무 잎 추출물의 페놀성 화합물 함량을 평가한 결과, 페놀성 화합물 함량이 높을수록 항산화 활성이 높았으며, 항산화 활성과 페놀성 화합물과의 연관성이 존재하였다.

FTIR 분석 결과, 항산화 활성이 높았던 메탄올 추출물의 acetone 및 물 분획물과 열수 추출물의 에탄올 분획물에서 공통적으로 수산기와 방향족화합물, 당류가 관찰되었다. 또한 이들의 GC-MS 분석 결과, 활성이 높았던 분획물에서 당류가 검출되었고, 열수 추출물의 경우, 에탄올 분획물에서 chlorogenic acid와 catechin, 그리고 당류가 검출되었다.

이와 같이 높은 라디칼 소거활성과 환원력을 나타내는 삼나무 잎의 메탄올 추출물과 열수 추출물의 항산화 능력은 수산기와 당을 함유한 페놀성 화합물에 의한 것으로서 테르펜 화합물로 이루어진 정유보다 높은 항산화 활성을 가지는 화합물로 판단된다. 삼나무 잎 추출물은 다양한 수산기 및 당을 포함한 페놀성 화합물을 함유하여 항산화 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Barlow, S.M. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. in: Food antioxidants. Springer, pp. 253-307.
- Benzie, I.F., Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239(1): 70-76.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C.,

- Soulimani, R. 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the neurological sciences* 262(1): 77-84.
- Branen, A. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 52(2): 59-63.
- Cha, B., Lee, S., Lee, H., Lee, E., Choi, M., Rhim, T., Park, H. 1997. Antioxidative effect of domestic plants. *Korean Journal of Pharmacognosy* 28: 15-20.
- Chambers, D.E., Parks, D.A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J.M., Yoshida, S., Parmley, L.F., Downey, J.M. 1985. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology* 17(2): 145-152.
- Chen, Z., Chan, P., Ho, K., Fung, K., Wang, J. 1996. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids* 79(2): 157-163.
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology* 41(6): 1067-1072.
- Choi, C.S., Song, E.S., Kim, J.S., Kang, M.H. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology* 35(6): 1216-1220.
- Decker, E.A., Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(3): 674-677.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(5): 1768-1774.
- Ebrahimzadeh, M.A., Enayatifard, R., Khalili, M., Ghaffarloo, M., Saeedi, M., Charati, J.Y. 2014. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. *Iranian journal of pharmaceutical research* 13(3): 1041-1047.
- Fantone, J.C., Ward, P. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The american journal of pathology* 107(3): 395-418.
- Ferguson, L.R. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475(1): 89-111.
- Hibatallah, J., Carduner, C., Poelman, M.C. 1999. In-vivo and In-vitro Assessment of the Free-radical-scavenger Activity of Ginkgo Flavone Glycosides at High Concentration. *Journal of pharmacy and pharmacology* 51(12): 1435-1440.
- Jimoh, F., Sofidiya, M., Afolayan, A. 2007. Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*. *Journal of medicinal food* 10(4): 707-711.
- Jung, H.A., Park, J.C., Chung, H.Y., Kim, J., Choi, J.S. 1999. Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Archives of pharmacal research* 22(2): 213-218.
- Jung, Y.T., Lee, I.S., Whang, K., Yu, M.H. 2012. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *Journal of Life Science* 22(3): 354-359.
- Kim, S.H., Lee, S.Y., Hong, C.Y., Gwak, K.S., Park, M.J., Smith, D., Choi, I.G. 2013. Whitening and antioxidant activities of bornyl acetate and nezu-

- kol fractionated from *Cryptomeria japonica* essential oil. International journal of cosmetic science 35(5): 484-490.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P., Groot, A.D., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical analysis 13(1): 8-17.
- Kuliscic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food chemistry 85(4): 633-640.
- Kweon, M.H., Hwang, H.J., Sung, H.C. 2001. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(10): 4646-4655.
- Kwon, S.C., Jeon, T.W., Park, J.S., Kwak, J.S., Kim, T.Y. 2012. Inhibitory Effect on Tyrosinase, ACE and Xanthine Oxidase, and Nitrite Scavenging Activities of Jubak (Alcohol filter cake) Extracts. Journal of Korean Society Food Science and Nutrition 41(9): 1191-1196.
- Lapornik, B., Prošek, M., Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of food engineering 71(2): 214-222.
- Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M.-T., Sekaki, A., Gardès-Albert, M. 1994. Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761. Methods in enzymology 234: 462-475.
- Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., Jennings, K.R. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. Free radical research 36(11): 1199-1208.
- Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H. 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 63(10): 1787-1790.
- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. Free Radical Biology and Medicine 27(5): 704-724.
- Park, S.N. 2003. Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. Korean journal of food science and technology 35(3): 510-518.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(6): 2111-2117.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y., Suzuki, T. 2004. Antioxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. Fisheries science 70(1): 183-188.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics 403(1): 136-138.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. Nutrition 21(2): 207-213.
- Senevirathne, M., Kim, S.-H., Siriwardhana, N., Ha, J.-H., Lee, K.-W., Jeon, Y.-J. 2006. Antioxidant potential of ecklonia cavaon reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. Food Science and Technology International 12(1): 27-38.

- Sivam, A., Sun-Waterhouse, D., Perera, C., Waterhouse, G. 2013. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Research International* 50(2): 574-585.
- Stobiecki, M. 2000. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54(3): 237-256.
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., Chowwanapoonpohn, S. 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry* 103(2): 381-388.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(10): 4113-4117.
- Wang, T., Jonsdottir, R., Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chemistry* 116(1): 240-248.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(3): 609-614.
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Salem, N.B., Gargouri, Y., Sayari, A. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *Lwt-Food science and technology* 50(2): 634-641.