

비타민나무(Sea Buckthorn, *Hippophae rhamnoides*) 잎 에탄올 농도별 추출물의 항산화활성 비교

박민규¹ · 주신윤^{1,*}
¹대전대학교 식품영양학과

Comparison of antioxidant activities of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extracts at different ethanol ratios

Min Gyu Park¹ and Shin Youn Joo^{1,*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Daejin University

Abstract This study was conducted to investigate the potential of sea buckthorn leaf (SBL) as a natural antioxidant. SBL was extracted using different ethanol ratios (0, 40, 80, and 100%), and the resulting extracts were examined for their antioxidant contents and antioxidant activities using various methods. The 40% and 80% ethanol extracts (EEs) showed higher total polyphenol contents of 285.06 and 285.64 mg GAE/g respectively, than those in other solvents, and as the ethanol concentration increased, other antioxidant contents of the extracts increased. The 40% and 80% EEs recorded the highest radical scavenging activities against DPPH, superoxide⁻, ABTS⁺, nitrite scavenging activity (NO⁻), and reducing power (RP). The NO⁻ and RP of the SBL EEs were higher than those of ascorbic acid or tannin, which are known as representative antioxidants. The results of this study, suggest that SBL is a potential source of natural antioxidants.

Keywords: sea buckthorn leaf, antioxidant content, antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity, ABTS⁺ radical scavenging activity

서 론

비타민나무(Sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*)는 보리수나무과 낙엽 활엽 관목에 속하며 산자나무, 갈매보리수나무, 시베리아 과일애플, 사극 및 사지 등으로 불린다(Busing과 Slabaugh, 2008; Kim 등, 2009). 비타민나무는 병충해가 적고 생명력이 강해 척박한 환경과 극악 조건인 기후(-43-40°C)에서도 생육이 가능할 정도로 재배 및 관리가 용이하며 현재 우리나라 북부지역을 중심으로 재배되고 있다(Kim 등, 2009; Park 등, 2010). 비타민나무는 100여 종 이상의 생리활성 성분을 함유하고 있고 비타민나무 잎은 catechin, quercetin, rutin, kaempferol, isorhamnetin 등을 함유하고 있어 생리활성이 높은 식물이며 이 물질들은 항산화, 항당뇨 및 항균효과 등에 탁월한 효과를 가지고 있다(Goncharova와 Glushenkova, 1993; Kim 등, 2010; Lee 등, 2010). 비타민나무에 대한 선행연구로는 항당뇨, 항암활성 및 항균효과 검증(Park 등, 2010), 항산화(Kim 등, 2011; Kim, 2013; Lee 등, 2018), 항비만(Jeong 등, 2015), tyrosinase 및 elastase 저해 활성(Kim 등, 2011) 등이 보고되고 있다.

최근에는 천연물의 질병치료 및 예방, 건강기능성 소재 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Yi 등, 2017). 산화적 손상을 가하는 H₂O₂, ·O₂ 및 ·OH 등의 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 NADPH oxidase, xanthine oxidase 및 cyclooxygenase 등의 세포 내 효소들에 의해 생성된다. 또한 대식세포나 호중구 및 면역과 관련된 세포들의 면역 반응으로 염증 반응이 개시되면 ·NO, ONOO⁻ 및 HNO₂ 등의 활성질소종(Reactive nitrogen species, RNS)이 다량으로 생성되는데 이 과정에서 활성산소종도 생성된다(Delanty와 Dichter, 1998; Brüne 등, 2003). 또한 과도한 스트레스, 흡연, 과음 및 피로 등으로 활성산소종이 생성될 수 있으며, 이로 인해 세포막과 단백질 분해, DNA 합성 및 세포 분자의 손상, 지방의 산화 등으로 심혈관 질환, 암 및 대사증후군 등 다양한 질병 발생을 야기한다(Kim 등, 2012; Lee 등, 2005). 활성산소는 체내 방어기작에 의해 대부분 소실되지만 과생성되면 항상성 유지 기능이 감소되어 수많은 질병 발생요인이 된다(Kim 등, 2005). 최근에는 식품에 존재하는 비타민 C, 비타민 E 및 폴리페놀 화합물 등의 다양한 항산화 물질들이 식품 섭취를 통해 체내에서 항산화제로서 작용하여 산화적 손상을 개선시킬 수 있다는 연구가 보고됨에 따라 체내 독성 및 부작용 등의 문제점이 제기되고 있는 합성 항산화제보다 안전하고 우수한 항산화 효능을 지닌 천연물 또는 식품 유래의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다(Byun 등, 2020; Choi 등, 2015).

따라서 본 연구에서는 비타민나무 잎을 이용하여 에탄올 농도를 달리한 추출물을 제조한 후 항산화물질 및 항산화활성을 측정하여 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

*Corresponding author: Shin Youn Joo, Department of Food Science and Nutrition, Daejin University, Pocheon, Gyeonggi 11159, Republic of Korea
Tel: +82-31-539-1865
Fax: +82-31-539-1860
E-mail: joo@daejin.ac.kr
Received December 18, 2020; revised January 26, 2021;
accepted January 26, 2021

재료 및 방법

실험재료 및 시료 제조

본 실험에 사용한 비타민나무 잎 분말은 강원비타민나무영농조합법인(2019년 2월)에서 생산된 것을 삼성생약(주)에서 구입하여 시료로 사용하였다. 항산화물질 및 항산화활성 측정에 사용한 Folin & Ciocalteu's reagent, 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외 시약 1급을 사용하였다.

비타민나무 잎 분말 100 g에 농도별(0, 40, 80, 100%) 에탄올 2,000 mL를 첨가하여 20°C, 24시간, 150 rpm으로 shaking incubator (SI-900R, JeioTech, Daejeon, Korea)에서 추출하였다. 추출액은 여과(Whatman No. 1, Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK)한 후 45°C에서 감압농축(R-114, Buchi, Flawil, Switzerland)하였다. 농축한 추출물은 동결건조(TFD, Ilshin Bio Base Co., Ltd., Dongducheon, Korea)한 후 분말화하여 -70°C의 초저온 냉동고(DF9010, Ilshin Bio Base co.)에 보관하면서 시료로 사용하였다. 항산화물질 및 항산화활성 측정을 위해 분말화한 시료를 에탄올에 용해(1 mg/mL)시킨 후 여과하여 시료액으로 사용하였다.

총 페놀, 총 플라보노이드 및 총 비타민 C 함량

비타민나무 잎 추출물의 총 페놀 함량은 Lin과 Tang(2007)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.1 mL에 Folin-Ciocalteu reagent 0.2 mL와 증류수 2 mL를 혼합하여 3분간 반응시킨 다음 10% Na₂CO₃ 2 mL를 넣고 암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도(EMC-18PC-UV, EMCLAB GmbH, Duisburg, Germany)를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 검량선을 작성하였고 시료 1 g당 mg gallic acid equivalent (mg GAE/g)로 결과를 나타내었다.

비타민나무 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Lee 등(1997)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.1 mL에 1 N NaOH 0.3 mL와 diethyleneglycol 2 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Naringin을 표준물질로 검량선을 작성하였고 시료 1 g당 mg naringin equivalent (mg NE/g)로 결과를 나타내었다.

총 비타민 C 함량은 식품공전(MFDS, 2020)의 방법을 이용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 분말과 metaphosphoric acid-acetic acid solution를 1:1로 혼합하여 균등한 죽 상태로 만들어 무게(W)를 측정 한 뒤 25 mL mass flask에 묽은 metaphosphoric acid-acetic acid solution으로 정용하였다. 이 용액을 여과하여 처음의 수 mL를 제거한 뒤 여액을 실험에 사용하였다. 여액 1 mL에 indophenol solution 1 방울과 metaphosphoric acid-thiourea solution 1 mL를 가한 뒤 dinitrophenylhydrazine 1 mL를 혼합하여 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액은 얼음물 내에서 냉각하면서 85% sulfuric acid 5 mL를 가하여 30분 반응시킨 뒤 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid 표준용액으로 검량선을 작성하였고 아래의 식으로 총 비타민 C 함량을 계산하여 나타내었다.

$$\text{Total ascorbic acid content (mg/100 g)} \\ = A / 1,000 \times 50 \times (B \times 2) / W \times 100 / B$$

A: calibration curve response value of ascorbic acid

B: weight of sample (g)

W: weight of sample and solution mixture (g)

클로로필 함량

비타민나무 잎 추출물의 클로로필(chlorophyll) 함량은 Chappelle 등(1992)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.25 g에 DMSO 25 mL를 가하여 30°C에서 24시간 동안 암소에서 색소를 추출한 뒤 648, 664 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래의 식으로 클로로필 함량을 계산하여 나타내었다.

$$\text{Chlorophyll a (g/mL)} = 12.25(A_{664 \text{ nm}}) - 2.79(A_{648 \text{ nm}})$$

$$\text{Chlorophyll b (g/mL)} = 21.50(A_{648 \text{ nm}}) - 5.10(A_{664 \text{ nm}})$$

$$\text{Total chlorophyll (g/mL)} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b}$$

A: the absorbance of the sample

DPPH 라디칼 소거능

비타민나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Lee 등(2007)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.5 mL에 DPPH 용액(1.5×10⁻⁴ M) 2 mL를 가하여 30분간 암소에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 대조군에 대해 50%의 소거능을 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)로 값을 나타냈다. 양성대조군(ascorbic acid)도 동일하게 실험하였다.

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

A: the absorbance of the sample

B: the absorbance of the blank

Superoxide⁻ 라디칼 소거능

비타민나무 잎 추출물의 superoxide⁻ 라디칼 소거능은 Wang 등(2007)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.1 mL에 0.4 mM xanthine과 0.24 mM 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT)를 1:1로 혼합한 용액 0.5 mL와 xanthine oxidase (0.049 unit/mL) 1 mL를 가하여 37°C에서 40분간 반응시켰다. 이 반응액에 69 mM SDS 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide⁻ 라디칼 소거능은 아래의 식으로 대조군에 대해 50%의 소거능을 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)로 값을 나타냈다. 양성대조군(tannic acid)도 동일하게 실험하였다.

$$\text{Superoxide}^- \text{ radical scavenging activity (\%)} = 100 - (A/B \times 100)$$

A: the absorbance of the sample

B: the absorbance of the blank

ABTS⁺ 라디칼 소거능

비타민나무 잎 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법에 응용하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 14:1의 비율로 혼합한 후 암소에서 20시간 반응시켜 ABTS solution을 제조하였다. 반응이 끝난 ABTS solution은 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.1 mL에 ABTS 용액 1.6 mL를 가하여 5분 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼 소거능은 아래의 식으로 대조군에 대해 50%의 소거능을 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)로 값을 나타냈다. 양성대조군(ascorbic acid)도 동일하게 실험하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical scavenging activity (\%)} = 100 - (A/B \times 100)$$

A: the absorbance of the sample

B: the absorbance of the blank

아질산염 소거능

비타민나무 잎 추출물의 아질산염 소거능은 Gray와 Dugan (1975)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.1 mL에 1 mM NaNO₂ 0.05 mL와 pH를 1.2로 조정한 0.1 N HCL 0.5 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이 반응액에 2% acetic acid 2.5 mL와 Griess reagent 0.2 mL를 넣고 혼합하여 15분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. Griess reagent는 1% sulfanilic acid와 1% 1-naphthylamine을 30% acetic acid를 이용하여 제조하였으며, 사용 직전에 1:1 비율로 섞어 만들었다. 아질산염 소거능은 아래의 식으로 대조군에 대해 50%의 소거능을 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)로 값을 나타냈다. 양성대조군(ascorbic acid)도 동일하게 실험하였다

$$\text{Nitrite scavenging activity (\%)} = 100 - (A/B \times 100)$$

A: the absorbance of the sample

B: the absorbance of the blank

환원력

비타민나무 잎 추출물의 환원력은 Wong과 Chye (2009)의 방법을 응용하여 측정하였다. 비타민나무 잎 추출물 0.5 mL에 pH를 6.6으로 조정한 0.2 M phosphate buffer 0.5 mL와 1% potassiumferricyanide 0.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분 반응시켰다. 이 반응액에 10% TCA 용액 0.5 mL와 0.1% FeCl₃ 0.2 mL를 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군(ascorbic acid)도 동일하게 실험하였다

통계처리

본 연구의 결과는 통계 프로그램 SPSS statistics (ver. 25, IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였으며, 유의성 검증을 위하여 ANOVA를 실시하여 평균값과 표준편차로 나타내었다. Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)를 이용하여 유의성이 있는 경우 사후 검증을 하였다. 상관관계 분석은 Pearson's correlation coefficient로 상관도를 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

총 페놀, 총 플라보노이드 및 총 비타민 C 함량

식물 유래 천연 항산화제인 폴리페놀은 한 개 이상의 -OH(수산기)를 갖고 있는 물질로 단백질과 효소, DNA 및 세포막 등의 활성산소에 의한 손상을 예방하는 중요한 항산화 물질이다(Tsao, 2010). 또한 식물체에서만 다량 존재하는 플라보노이드는 폴리페놀의 일종으로 C₆-C₃-C₆이 기본 골격을 가지고 있으며 활성이 매우 높은 항산화물질이다. 플라보노이드에는 tannins, catechins,

anthocyanidins 등이 있다(Heim 등, 2002). 수용성 비타민 C는 필수 영양양소로 체내에서 합성이 이루어지지 않으며 외부로부터 공급받아야 한다. 비타민 C는 산화적 손상을 받으면 가장 먼저 항산화 역할을 하고 효과적으로 비타민 및 산소 유리기를 제거하는 작용뿐만 아니라 지질이 산화되는 과정 중 다가불포화지방산의 산화적 손상을 예방한다(Jackson 등, 1985). 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 총 페놀, 총 플라보노이드, 총 비타민 C 함량은 Table 1에 제시하였다.

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 총 페놀 함량은 188.10-285.64 mg GAE/g으로 측정되었다. 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 각각 285.06, 285.64 mg GAE/g으로 높은 함량을 보였으며 100% 에탄올 추출물이 낮은 함량을 보였다($p < 0.001$). 폴리페놀은 대다수 당이나 수용성 단백질이 hydroxyl기와 ether 결합으로 존재하여 극성용매에 대한 용해성이 증가한다(Woo, 1995). Lee 등(2018)은 비타민나무 잎을 0, 50, 80% 에탄올 농도별로 추출한 결과, 에탄올의 농도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량이 증가하는 경향을 보여 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 다만, 본 연구에서는 100% 에탄올 추출물이 다른 시료에 비해 총 폴리페놀 함량이 낮게 나타났는데, Nam 등(2015)의 산사나무 연구에서는 물과 에탄올이 혼합된 용액에서 침투 용이성이 증가하여 100% 에탄올 보다 폴리페놀의 용해도가 증가한다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다.

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량은 72.28-123.78 mg NE/g으로 측정되었다. 100% 에탄올 추출물이 123.78 mg NE/g으로 가장 높았으며, 에탄올 농도가 증가할수록 총 플라보노이드 함량이 증가하였다($p < 0.001$). 플라보노이드류는 polyphenolic substance로서 화학구조에 따라 물과 에탄올에 대한 용해도에 차이가 있다고 보고되었다(Middleton과 Kandaswami, 1992). Shin (2017)은 비타민나무 잎을 에탄올 농도별로 추출한 결과, 에탄올의 농도가 증가할수록 총 플라보노이드 함량이 증가하는 경향을 보고하였으며 이는 본 연구 결과와 유사하였다.

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 총 비타민 C 함량은 458.20-807.11 mg/100 g으로 측정되었으며 100% 에탄올 추출물이 807.11 mg/100 g으로 높은 함량을 보였다. Cho 등(2014)은 비타민나무 잎을 0, 80% 에탄올로 추출한 결과, 추출물의 총 비타민 C 함량은 각각 85-202 mg/100 g이 함유되어 있다고 보고하여 본 연구 결과보다 낮게 나타났는데, 이는 본 실험과 Cho 등(2014)의 시료 추출 조건의 차이에 의해 기인한 것으로 사료된다.

클로로필 함량

클로로필은 녹색 색소로 채소나 과일의 신선함을 나타내는 지표이며 식욕을 돋우고 상처치료, 조혈, 간 기능 증진작용 및 탈취작용과 세균 생육 정지효과 등이 있다(Endo 등, 1984). 클로로

Table 1. Total polyphenol, total flavonoid and total ascorbic acid contents of sea buckthorn leaf extracts at different ethanol ratios

Extracts	TPC ¹⁾ (mg GAE ²⁾ /g)	TFC (mg NE/g)	TAC (mg/100 g)
0% EtOH	199.12±6.27 ^{3)bd4)}	72.28±1.53 ^a	636.68±16.6 ^b
40% EtOH	285.06±7.24 ^a	88.78±1.53 ^b	678.69±67.69 ^b
80% EtOH	285.64±2.06 ^d	101.95±6.95 ^c	458.20±7.29 ^c
100% EtOH	188.10±4.04 ^c	123.78±2.36 ^d	807.11±37.37 ^a

¹⁾TPC: total polyphenol content, TFC: total flavonoid content, TAC: total ascorbic acid content.

²⁾GAE: gallic acid equivalent, NE: naringin equivalent.

³⁾Data are mean±standard deviation (n=3).

⁴⁾Different superscripts (a-d) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

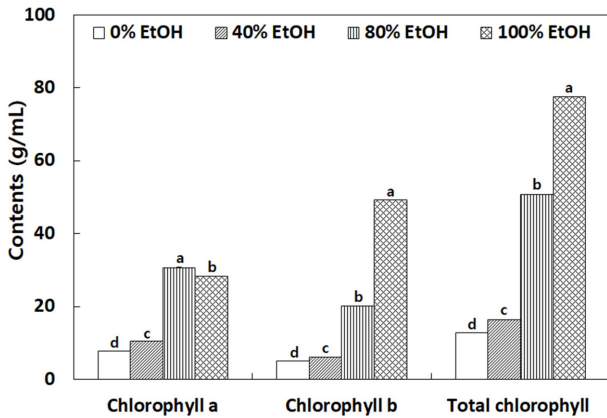


Fig. 1. Chlorophyll contents of sea buckthorn leaf extracts at different ethanol ratios. Different letters (a-d) above bars indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

필 a와 b 그리고 pheophytin a와 b는 자동산화반응 체계에서 α -tocopherol 및 β -carotene 보다 더 강한 항산화능을 보이고 클로로필 및 그 유도체 중 클로로필 a가 항산화능이 가장 크다(Endo 등, 1985; Cheigh 등, 1999). 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 클로로필 함량은 Fig. 1에 제시하였다.

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 클로로필 a 함량은 7.77-30.65 g/mL, 클로로필 b 함량은 4.96-49.20 g/mL, 총 클로로필 함량은 12.74-77.58 g/mL로 측정되었다($p < 0.001$). 클로로필 a의 경우 80% 에탄올 추출물의 함량이 가장 높았고, 클로로필 b와 총 클로로필 함량은 100% 에탄올 추출물의 함량이 가장 높게 나타났다. Li 등(2014)은 고구마 잎을 에탄올 농도별로 추출한 결과, 클로로필 a 함량은 0.30-6.06 mg/g로 측정되었고 클로로필 b 함량은 0.12-2.25 mg/g로 측정되었으며 총 클로로필 함량은 0.42-8.20 mg/g로 측정되었다고 보고하였다. 에탄올 추출물이 물 추출물보다 클로로필 함량이 높았다는 점이 본 연구 결과와 유사하게 나타났으며, 비타민나무 잎 추출물의 클로로필 함량이 고구마 잎에 비해 상당히 높은 것을 알 수 있었다.

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 라디칼을 포함하는 보라색 화합물

(diphenylpicrylhydrazyl)이 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하여 탈색(diphenylpicrylhydrazine)되는 원리를 이용한 항산화 실험으로 간편하게 측정할 수 있어 널리 이용된다(Blois, 1958).

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 IC_{50} 값으로 나타낸 결과는 Table 2에 제시하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 IC_{50} 값은 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 각각 49.18, 49.03 μ g/mL로 활성이 가장 좋았고 0% 에탄올 추출물(70.50 μ g/mL), 100% 에탄올 추출물(94.34 μ g/mL) 순으로 나타나 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 소거능을 보였다($p < 0.001$). 표준물질로 사용한 ascorbic acid의 IC_{50} 값은 20.54 μ g/mL로 나타났다. Lee 등(2018)은 비타민나무 잎의 50, 80% 에탄올 추출물이 0% 에탄올 추출물보다 DPPH 라디칼 소거능이 높은 경향을 보였고, Shin (2017), Choi 등(2016)도 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보고하여 본 연구 결과와 유사하게 나타났다. 본 연구에서 100% 에탄올 추출물이 다른 시료에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 낮게 나타났는데, Chung (2012)은 총 페놀 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거능이 높아진다고 보고하여 본 연구의 총 페놀 함량 증가와 같은 경향을 보여준다. 반면, Kim 등(2011)은 비타민나무 잎 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50} 값이 2.95 μ g/mL로 보고하여 본 연구의 에탄올 추출물 결과에 비해 매우 높은 활성을 나타냈다. 이는 본 연구의 시료 추출시간에 비해 약 12배 이상 긴 시간을 추출한 것에 따른 결과라고 생각된다. 또한 선행연구(Joo, 2020; Kim 등, 2011)에서 에틸아세테이트 분획물은 에탄올 추출물에 비해 항산화 활성이 높은 것으로 보고되어 본 연구의 에탄올 추출물에 비해 선행연구의 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성이 높게 나타난 것은 이러한 경향이 반영된 것으로 사료된다.

Superoxide⁻ 라디칼 소거능

Superoxide⁻ 라디칼 소거능은 xanthine oxidase에 의하여 생성된 superoxide⁻ 라디칼과 NBT가 반응하여 청색의 superoxide⁻ radical-NBT 복합체를 형성한 후 이 복합체가 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하여 탈색되는 원리를 이용한다(Gülçin, 2006). Hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH), singlet oxygen (1O_2) 등의 전구체인 superoxide⁻ radical ($O_2^{\cdot-}$)은 세포나 신경조직의 손상을 야기하는 라디칼로 강한 독성이 있다(Jin, 2011).

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 superoxide⁻ 라디칼 소

Table 2. DPPH radical, superoxide⁻ radical, ABTS⁺ radical and nitrite scavenging activity of sea buckthorn leaf extracts at different ethanol ratios

Extracts	Antioxidant activities (IC_{50}^1), μ g/mL)			
	DSA ²⁾	SSA	ASA	NSA
0% EtOH	70.50 \pm 0.62 ^{3) b4)}	76.42 \pm 5.36 ^b	99.82 \pm 3.22 ^b	5.72 \pm 0.44 ^c
40% EtOH	49.18 \pm 1.54 ^c	60.80 \pm 7.18 ^{bc}	67.52 \pm 1.58 ^c	5.15 \pm 0.23 ^c
80% EtOH	49.03 \pm 1.38 ^c	65.13 \pm 2.36 ^b	65.71 \pm 1.70 ^c	4.24 \pm 0.17 ^c
100% EtOH	90.34 \pm 3.06 ^a	363.03 \pm 50.60 ^a	118.95 \pm 0.57 ^a	8.24 \pm 0.15 ^b
Ascorbic acid	20.54 \pm 1.11 ^d	-	46.32 \pm 0.55 ^d	236.95 \pm 2.14 ^a
Tannic acid	-	20.18 \pm 0.66 ^c	-	-

¹⁾Amount required for 50% reduction of scavenging activity.

²⁾DSA: DPPH radical scavenging activity, SSA: superoxide⁻ radical scavenging activity, ASA: ABTS⁺ radical scavenging activity, NSA: nitrite scavenging activity

³⁾Data are mean \pm standard deviation (n=3).

⁴⁾Different superscripts (a-d) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

거능을 측정하여 IC₅₀값으로 나타낸 결과는 Table 2에 제시하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 superoxide 라디칼 소거능을 측정된 IC₅₀값은 40% 에탄올 추출물이 60.80 µg/mL로 활성이 가장 좋았고 0% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 각각 76.42, 65.13 µg/mL로 유의적인 차이가 없었으며 100% 에탄올 추출물이 363.03 µg/mL로 낮았다($p < 0.001$). 표준물질로 사용한 tannic acid의 IC₅₀값은 20.18 µg/mL로 나타났다.

Superoxide 라디칼 소거능의 표준물질로 tannic acid를 사용하였는데, 이는 ascorbic acid나 vitamin E 또는 BHA, BHT 등의 항산화제는 superoxide 라디칼 소거능에 영향을 주지 못한다는 Chung (2015)과 Jung 등(2004)의 연구 결과를 따른 것이다.

Kim과 Kim(2019)은 동의 잎의 에탄올 농도별 추출물의 superoxide 라디칼 소거능 측정 결과, 에탄올의 농도가 증가할수록 높은 활성을 보였으나 에탄올 농도가 80% 이상일 경우 활성이 낮아지는 경향을 보여 본 연구 결과와 유사하였다. Kim 등(2009)은 비타민나무 잎 추출물의 superoxide 라디칼 소거능을 측정한 결과, 물 추출물이 11.35%, 에탄올 추출물이 33.23%로 물 추출물보다 에탄올 추출물이 1.6-5.4배 더 높은 것으로 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다.

ABTS⁺ 라디칼 소거능

ABTS⁺ 라디칼 소거능은 친수성(hydrophilic) 및 소수성(hydrophobic)의 항산화 물질에 모두 적용 가능하여 다양한 시료의 항산화 활성에 적용할 수 있다(Evans와 Miller, 1997). ABTS⁺ 라디칼 소거능은 암소에서 ABTS와 potassium persulfate가 반응하여 생성된 청록색의 ABTS⁺ 라디칼은 항산화 활성을 갖는 물질로 인해 라디칼이 소거되어 탈색되는 원리를 이용한다(Re 등, 1999).

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하여 IC₅₀값으로 나타낸 결과는 Table 2에 제시하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정한 IC₅₀값은 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 각각 67.52, 65.71 µg/mL로 활성이 높았고 0% 에탄올 추출물이 99.82 µg/mL, 100% 에탄올 추출물이 118.95 µg/mL로 낮은 활성을 나타내었다($p < 0.001$). 표준물질로 사용한 ascorbic acid의 IC₅₀값은 46.32 µg/mL로 나타났다. Shin (2017)은 비타민나무 잎의 ABTS⁺ radical 소거능을 측정한 결과, 0% 에탄올 추출물 26.74%, 70% 에탄올 추출물 76.24%로 에탄올의 농도가 증가할수록 소거능이 높아진다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서 100% 에탄올 추출물이 다른 시료에 비해 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 감소하였는데, 이는 앞선 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사한 경향을 보여준다.

아질산염 소거능

아질산염은 동물성 가공식품의 발색이나 산패방지 및 독소 생성억제를 위해 사용되는 물질로 과량 섭취할 경우 혈액 중 헤모글로빈의 산화로 메트 헤모글로빈이 형성되어 심각한 중독 증상을 야기한다. 또한 amine과 낮은 산성 조건에서 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성한다고 알려져 있다(Swann, 1975; White, 1975). 아질산염을 소거하는 대표적인 항산화 물질은 ascorbic acid, α -tocopherol 및 페놀성 화합물 등이 있으며 아질산염의 소거능에 따라 간접적으로 항산화 물질의 함량을 알 수 있다고 보고되어 있다(Byers와 Perry, 1992).

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 아질산염 소거능을 측정하여 IC₅₀값으로 나타낸 결과는 Table 2에 제시하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 IC₅₀값은 0% 에탄올, 40% 에탄올, 80% 에탄올 추출물이 각각 5.72, 5.15, 4.24 µg/mL로 높은 활성을 나타냈고 100% 에탄올 추출물이 8.24 µg/mL로 다른 추출물에 비해 다소 낮은 활성을 나타냈다($p < 0.001$). 표준물질로 사용한 ascorbic acid의 IC₅₀값은 236.95 µg/mL로 나타나 비타민나무 잎 추출물이 이에 비해 매우 높은 활성을 나타냈다. Lee 등(2018)은 비타민나무 잎의 50%, 80% 에탄올 추출물이 0% 에탄올 추출물보다 아질산 소거능이 높다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 식물에 함유된 phenol성 화합물은 amine보다 아질산염과 빠르게 반응하여 효과적으로 nitrosamine의 생성을 억제하므로 폴리페놀 함량과 아질산염 소거능은 비례적인 상관관계로 알려져 있다(Chung, 2012). 본 연구에서 100% 에탄올 추출물이 다른 시료에 비해 아질산 소거능이 낮게 나타났는데, 이는 100% 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량이 다른 시료에 비해 낮아서 나타난 결과로 생각된다.

환원력

환원력은 항산화 물질이 존재하는 시료에서 Fe³⁺ (ferric iron)을 Fe²⁺ (ferrous iron)으로 환원시키는 정도를 반응물의 흡광도로 측정하는 것으로, 흡광도의 증가가 곧 시료의 환원력을 나타낸다. 환원력은 reductone과 관련이 있으며 항산화 작용을 하는 reductone은 수소 원자를 제공하면서 자유 라디칼의 연쇄 반응을 억제시켜 잠재적인 항산화 활성을 지니고 있다(Liu와 Yao, 2007).

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 환원력을 측정한 결과는 Table 3에 제시하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 환원력은 시료의 농도가 증가할수록 활성이 증가하였으며 500 µg/mL에서 80% 에탄올 추출물이 2.73 O.D. 가장 높았고 40% 에탄올 추출물(2.60 O.D.), 100% 에탄올 추출물(2.50 O.D.), 0% 에탄올 추출물(2.27 O.D.) 순이었다($p < 0.001$). 시료 농도 62.5-250

Table 3. Reducing power of sea buckthorn leaf extracts at different ethanol ratios

Extracts	Concentration (µg/mL)			
	62.5	125	250	500
0% EtOH	0.70±0.00 ^{1)(c2)D3)}	1.27±0.06 ^{cC}	2.07±0.12 ^{cB}	2.27±0.15 ^{dA}
40% EtOH	0.90±0.00 ^{bD}	1.67±0.06 ^{bC}	2.27±0.06 ^{bB}	2.60±0.10 ^{bCA}
80% EtOH	0.97±0.06 ^{bD}	1.73±0.06 ^{bC}	2.37±0.06 ^{bB}	2.73±0.12 ^{bA}
100% EtOH	0.60±0.00 ^{dD}	1.07±0.06 ^{dC}	1.90±0.00 ^{dB}	2.50±0.00 ^{cA}
Ascorbic acid	2.70±0.10 ^{aB}	2.93±0.06 ^{aA}	3.00±0.00 ^{aA}	3.00±0.00 ^{aA}

¹⁾Data are mean±standard deviation (n=3).

²⁾Different superscripts (a-d) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

³⁾Different superscripts (A-D) in a row indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. Pearson correlation between the antioxidant contents and antioxidant capacity parameters of sea buckthorn leaf extracts at different ethanol ratios

Extracts	Antioxidant contents ¹⁾					Antioxidant activities ²⁾					
	TPC	TFC	TAC	CaC	CbC	TCC	DSA	SSA	ASA	NSA	RP
Antioxidant contents											
TPC	1										
TFC	-0.094	1									
TAC	-0.655* ³⁾	0.338	1								
CaC	0.123	0.836**	-0.160	1							
CbC	-0.421	0.931**	0.476	0.767**	1						
TCC	-0.235	0.949**	0.258	0.902**	0.969**	1					
Antioxidant activities											
DSA	0.969**	-0.302	-0.705*	-0.049	-0.596*	-0.419	1				
SSA	0.686*	-0.777**	-0.664*	-0.503	-0.923**	-0.815**	0.821**	1			
ASA	0.981**	-0.223	-0.708**	0.024	-0.534	-0.350	0.990**	0.764**	1		
NSA	0.852**	-0.317	-0.359	-0.286	-0.600*	-0.513	0.893**	0.738**	0.873**	1	
RP	0.715**	0.382	-0.417	0.564	0.154	0.322	0.619*	0.206	0.625*	0.506	1

¹⁾TPC: total polyphenol content, TFC: total flavonoid content, TAC: total ascorbic acid content, CaC: chlorophyll a content, CbC: chlorophyll b content, TCC: total chlorophyll content.

²⁾DSA: DPPH radical scavenging activity, SSA: superoxide radical scavenging activity, ASA: ABTS⁺ radical scavenging activity, NSA: nitrite scavenging activity, RP: reducing power.

³⁾* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

$\mu\text{g/mL}$ 에서는 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 가장 높았고, 그 다음으로 0% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물 순이었다($p < 0.001$). Shin (2017)은 비타민나무 잎의 0% 에탄올 추출물보다 70% 에탄올 추출물의 활성이 높다고 보고하였고, Chung (2012)은 총 페놀 함량이 높으면 환원력이 높다고 보고하여 본 연구에서 환원력이 총 페놀 함량 증감과 같은 경향을 보였다.

상관관계

에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 항산화 물질과 항산화 활성 간의 상관성을 분석한 결과는 Table 4에 제시하였다. 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능($r = 0.969$, $p < 0.01$), ABTS⁺ 라디칼 소거능($r = 0.981$, $p < 0.01$), 아질산염 소거능($r = 0.852$, $p < 0.01$), 총 플라보노이드 함량과 클로로필 a ($r = 0.836$, $p < 0.01$), 클로로필 b ($r = 0.931$, $p < 0.01$), 총 클로로필($r = 0.949$, $p < 0.01$)은 강한 양의 상관관계를 보였다. 클로로필 a와 총 클로로필($r = 0.902$, $p < 0.01$)은 강한 양의 상관관계를 보였다. 클로로필 b와 총 클로로필($r = 0.969$, $p < 0.01$)은 강한 양의 상관관계를 보였으며, superoxide 라디칼 소거능($r = -0.923$, $p < 0.01$)은 강한 음의 상관관계를 보였다. 총 클로로필과 superoxide 라디칼 소거능($r = -0.815$, $p < 0.01$)은 다소 높은 음의 상관관계를 보였다. DPPH 라디칼 소거능과 superoxide 라디칼 소거능($r = 0.821$, $p < 0.01$), ABTS⁺ 라디칼 소거능($r = 0.990$, $p < 0.01$), 아질산염 소거능($r = 0.893$, $p < 0.01$)은 강한 양의 상관관계를 보였다. ABTS⁺ 라디칼 소거능과 아질산염 소거능($r = 0.873$, $p < 0.01$)은 강한 양의 상관관계를 보였다. 이상의 결과로 추출물의 총 폴리페놀 함량이 항산화능과 직접적인 관계가 있으며 총 플라보노이드, 비타민 C, 클로로필 함량과 항산화능은 직접적인 관계가 적은 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 에탄올 농도를 달리한 비타민나무 잎 추출물의 항산화 물질 및 항산화 활성을 측정하였다. 에탄올 농도별 비타민나무 잎 추출물의 총 페놀 함량은 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 각각 285.06, 285.64 mg GAE/g으로 높은 함량을 보였으며, 총 플라보노이드, 총 비타민 C, 클로로필 a, 클로로필 b, 총 클로로필 함량은 각각 100% 에탄올 추출물이 123.78 mg NE/g, 807.11 mg/100 g, 30.65, 49.20, 77.58 g/mL로 높은 함량을 보였다. 항산화 활성은 40% 에탄올 추출물과 80% 에탄올 추출물이 DPPH 라디칼 소거능(IC₅₀ 49.18, 49.03 $\mu\text{g/mL}$), ABTS⁺ 라디칼 소거능(IC₅₀ 67.52, 65.71 $\mu\text{g/mL}$), 아질산염 소거능(IC₅₀ 5.15, 4.24 $\mu\text{g/mL}$) 및 환원력(0.90-2.60, 0.97-2.73 O.D.)에서 가장 활성이 좋았고 superoxide 라디칼 소거능은 40% 에탄올 추출물이 IC₅₀ 60.80 $\mu\text{g/mL}$ 로 활성이 좋았다. 또한 아질산염 소거능과 ABTS⁺ radical 소거능의 경우 비교군보다 활성이 좋거나 비슷하여 비타민나무 잎의 천연 항산화 물질로의 활용 가능성을 확인하였다. 항산화 물질과 항산화 활성 간의 상관관계를 분석한 결과 상관계수가 0.715-0.990으로 양의 상관관계를 나타냈다. 따라서 비타민나무 잎 추출물 제조 시 40% 에탄올 및 80% 에탄올 용매를 사용할 경우 높은 항산화 활성을 나타내어 천연 항산화제로 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

References

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
 Brüne B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and

- apoptosis. *Kidney Int.* 84: S22-S24 (2003)
- Busing RT and Slabaugh PE. *Hippophae rhamnoides* L. common seabuckthorn. In: Bonner, F.T., Karrfalt, R.P. (Eds), The woody plant seed manual, Agriculture Hand Book 727, USDA Forest Service, USA, pp. 588-590 (2008)
- Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* 12: 139-159 (1992)
- Byun EB, Kim MJ, Kim SJ, Oh NS, Park SH, Kim WS, Byun EH. Antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts from the core of *Diospyros kaki*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52: 60-66 (2020)
- Chappelle EW, Kim MS, McMurtrey III JE. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sens. Environ.* 39: 239-247 (1992)
- Cheigh HS, Song ES, Jeon YS. Changes of chemical and antioxidant characteristics of chlorophylls in the model system of mustard leaf kimchi during fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 520-525 (1999)
- Cho H, Cho E, Jung H, Yi HC, Lee B, Hwang KT. Antioxidant activities of sea buckthorn leaf tea extracts compared with green tea extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 1295-1303 (2014)
- Choi JY, Jo MK, Goo YM, Kim HK, Shin JW, Kim DY, Cho YJ. Antioxidant activities of phenolic compounds from medicinal plants (*Hibiscus esculentus*, *Cirsium japonicum*, *Zizania latifolia* and *Kalopanax pictus*). *Curr. Res. Agric. Life Sci.* 33: 57-63 (2015)
- Choi SJ, Kim NR, Shin JY, Lee KM, Kyong KY. Evaluation of anti wrinkle efficacy in sea buckthorn extracts, oil and nanoemulsion containing them. *Korean Society of Cosmetics and Cosmetology.* 6: 127-137 (2016)
- Chung HJ. Comparison of physicochemical properties and physiological activities of commercial fruit juices. *Korean J. Food Preserv.* 9: 712-719 (2012)
- Chung HJ. Comparative study of antioxidant activity of imported tropical and subtropical fruits. *Korean J. Food Preserv.* 22: 577-584 (2015)
- Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* 98: 145-153 (1998)
- Endo Y, Usuki R, Kaneda T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 781-784 (1984)
- Endo Y, Usuki R, Kaneda T. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. comparison of the inhibitory effects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 1375-1378 (1985)
- Evans C, Miller NJ. Factors affecting the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radic. Res.* 195: 26-27 (1997)
- Goncharova NP, Glushenkova AI. Lipids of the leaves of central asian forms of sea buckthorn. *Chem. Nat. Compd.* 29: 797-798 (1993)
- Gray JI, Dugan JrLR. Inhibition of n-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984 (1975)
- Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 217: 213-220 (2006)
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572-584 (2002)
- Jackson MJ, Edwards RHT, Symons MCR. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *BBA-Mol. Cell Res.* 847: 185-190 (1985)
- Jeong HJ, Park JH, Kim MJ. Ethanol extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J. Plant Res.* 28: 582-590 (2015)
- Jin SY. Study on antioxidant activities of extracts from different parts of korean and iranian pomegranates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 1063-1072 (2011)
- Joo SY. Comparison of *Prunus yedoensis* matsumura bark ethanol extract and solvent fraction antioxidant activities. *Korean J. Food Sci. Technol.* 52: 350-356 (2020)
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *Appl. Biol. Chem.* 47: 135-140 (2004)
- Kim MW. Effect of sea buckthorn leaves on hepatic enzyme levels in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 40-45 (2013)
- Kim JE, Chae KY, Park SN. Antioxidative and inhibitory activities on tyrosinase of *Hippophae rhamnoides* leaf extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 37: 265-273 (2011)
- Kim MJ, Chu WM, Park EJ. Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1041-1048 (2012)
- Kim KC, Kim JS. Physiological activity of the extract from dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum makino*) leaves tea by different ethanol concentrations. *J. Plant Biotechnol.* 46: 37-44 (2019)
- Kim KM, Park MH, Kim KH, Im SH, Park YH, Kim YN. Analysis of chemical composition and in vitro anti-oxidant properties of extracts from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *Appl. Biol. Chem.* 52: 58-64 (2009)
- Kim JH, Yoon SJ, Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim TW, Cho YJ. Screening of biological activities of the extracts from basil (*Ocimum basilicum* L.). *Appl. Biol. Chem.* 48: 173-177 (2005)
- Kim JS, Yu CY, Kim MJ. Phamalogical effect and component of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Plant Biotechnol.* 37: 47-56 (2010)
- Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. Compositions of opuntia *ficus-indica*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 847-853 (1997)
- Lee SA, Jo HK, Cho SH, Ko SK. Comparison of the contents of phenolic compounds of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) cultivated in Korea and Mongolia. *Kor. J. Pharmacogn.* 41: 308-312 (2010)
- Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 33-240 (2005)
- Lee SJ, Shin JH, Choi DJ, Kwon O. Quality characteristics of cookies prepared with fresh and steamed garlic powders. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1048-1054 (2007)
- Lee SY, Shon JY, Kang KO. Nutritional components and antioxidant activities of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf and berry extracts. *J. East Asian Soc. Diet Life.* 28: 31-39 (2018)
- Li M, Jang GY, Lee SH, Kim ST, Lee JH, Hwang SG, Jeong HS. Optimization of extraction conditions for useful components from sweet potato leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1749-1756 (2014)
- Lin JY, Tang CY. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 101: 140-147 (2007)
- Liu Q, Yao H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem.* 102: 732-737 (2007)
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Food code. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=31. Accessed Dec. 12, 2020
- Middleton JrE, Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1167-1179 (1992)
- Nam SM, Kang IJ, Shin MH. Anti-diabetic and anti-oxidative activities of extracts from *Crataegus pinnatifida*. *J. East Asian Soc. Diet Life.* 25: 270-277 (2015)
- Park YH, Lim SH, Ham HJ, Jeong HN, Lee KJ, Kim KH, Kim SM. Comparison of biological activities of extracts from different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 975-979 (2010)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Shin EH. Effect of extraction conditions on in vitro antioxidant properties of extracts from *Hippophae rhamnoides* leaves. *Culi. Sci.*

- Hos. Res. 23: 90-97 (2017)
- Swann PF. The toxicology of nitrate, nitrite and n-nitroso compounds. J. Sci. Food Agric. 26: 1761-1770 (1975)
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2: 1231-1246 (2010)
- Wang J, Yuan X, Jin Z, Tian Y, Song H. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. Food Chem. 104: 242-250 (2007)
- White JW. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. J. Agr. Food Chem. 23: 886-891 (1975)
- Wong JY, Chye FY. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. J. Food Compos. Anal. 22: 269-277 (2009)
- Woo WS. Phenolic compound. In: Natural Product Chemistry Method. 2nd ed. Seoul National University, Seoul, Korea. pp. 61-157 (1995)
- Yi MR, Kang CH, Bu HJ. Antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts from red beet (*Beta vulgaris*) root. Korean J. Food Preserv. 24: 413-420 (2017)