

Study on antioxidant and physiological activities of extract from *Ligularia fischeri* by extraction methods

Yeon-jeong Woo, Seung-Ryeul Shin, Ju-Yeon Hong *

Faculty of Herbal Food Cuisine and Nutrition, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

추출방법을 달리한 곱취(*Ligularia fischeri*) 추출물의 항산화 및 생리활성에 관한 연구

우연정 · 신승렬 · 홍주연 *

대구한의대학교 한방식품조리영양학부

Abstract

The purpose of this study was to determine antioxidant and physiological activities of water and 70% ethanol extracts from *Ligularia fischeri* by extraction methods. The yield of water and ethanol extracts from *Ligularia fischeri* was 15.23% and 17.45%, respectively. The polyphenol and flavonoid contents of ethanol extracts of *Ligularia fischeri* (LEE) were 17.17 ± 4.38 mg/g, 35.06 ± 6.69 mg/g, respectively. The electron donating ability and SOD like activity, and ABTS radical ability of all *Ligularia fischeri* extracts were increased in a dose dependent manner, and those was the highest in LEE. Nitrite scavenging ability was higher in pH 1.2 than that in pH 3.0, and ethanol extract showed higher ability in pH 1.2 and 3.0. The xanthine oxidase and inhibition effect of all *Ligularia fischeri* extracts on tyrosinase were dose-dependently increased, and those was the highest in ethanol extracts of *Ligularia fischeri*. Reducing power was 1.2 at extract concentration 1,000 μ g/mL in water and ethanol extracts of *Ligularia fischeri* and the highest in water extract of *Ligularia fischeri* at concentration of 62.5-500 μ g/mL. These results may contribute to development of processed food and health functional food with *Ligularia fischeri*.

Key words : *Ligularia fischeri*, antioxidant, physiological activities, functionality

서 론

최근 세계적으로 경제발전에 따른 전체적인 식품소비 구조의 변화, 특히 식품의 웰빙화, 건강 기능성 식품의 소비 증가 등의 식생활 환경의 변화는 건강한 삶에 대한 욕구를 증가시키고 있으며, 이와 함께 고부가가치 식품 및 건강 기능성 식품산업에 대한 수요와 시장규모를 점차 확대시키고 있다(1). 건강한 삶에 대한 욕구는 건강, 체지방 감소, 항산화, 면역 증강 등 구체화됨에 따라 개별 욕구와 관련된

기능성 원료를 함유한 다양한 건강 기능 식품이 연구·개발되고 있다(2). 아울러 평균수명이 길어지면서 건강한 노후에 대한 관심이 고조되고 천연물 중 부작용이 없고 유독하지 않은 소재를 이용한 건강 유지 및 증진에 대한 요구가 증가하고 있다(3).

식물성 식품에 널리 존재하는 페놀 화합물 및 비타민 등의 천연 항산화제가 산화손상에 대한 화학적 예방 촉매기능(4)이 알려짐에 따라 저공해 채소류, 약리작용이 우수한 채소 및 산채류에 대한 관심이 커지고 있다(5,6). 산채류는 비타민류와 무기질을 많이 함유하고 있으며(7), 약리효능으로는 항종양 및 암세포에 대한 세포독성(8), 간기능 개선(9), 항비만(10), 항균효과(11) 등이 보고되고 있다. 특히 산채류는 약리작용과 건강 기능성이 탁월하여 인간의 삶과 질을 향상시켰으며, 이는 산야의 자생 또는 재배 산채류가 메디케어 관련 건강기능식품, 뷰티 화장품, 의약품 등의

*Corresponding author. E-mail : pinkpunk@dhu.ac.kr
Phone : 82-53-819-1426, Fax : 82-53-819-1494
Received 11 October 2017; Revised 12 December 2017;
Accepted 18 December 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

소재로 사용이 가능할 것으로 평가하였다(12).

곰취(*Ligularia fischeri*)는 국화과(菊花科)에 속하는 다년생 초본식물로 웅소(雄蔬)라고도하며 곰취라는 이름은 곰이 좋아하는 나물에서 온 것이다(13). 곰취는 유럽과 아시아에 10여종이 분포하는데 그중에서 9종이 우리나라의 품종이며, 어린잎을 식용으로 이용하는데 주로 나물이나 쌈, 장아찌로 섭취한다. 약리학적 측면에서 살펴보면 곰취는 예로부터 기침, 가래, 다리 아픔, 요통, 두통, 백일해, 천식에 효험을 나타내며(14), 혈액순환을 활발하게 한다고 알려져 있다. 민간에서는 황달, 고혈압, 간장병에 사용했으며, 다치고 헌데에 균이 들어간 전염성피부(단독)병과 고름집에 잎을 찢어 붙이곤 했다(15). 영양적인 측면에서 곰취는 각종 비타민과 무기질을 고루 함유하고 있다. 그 중 비타민A 780 RE/100 g, β -carotene 4,681 μ g/100 g, 칼슘 241 mg/100 g, 칼륨 778 mg/100 g, 섬유소 1.7 g/100 g을 함유하며, 철분은 30.926 mg/100 g으로 매우 높게 함유하고 있다(16). 곰취의 아미노산 총량은 3,562 mg/100 g으로 이 중 풍미와 관련된 아미노산인 glutamic acid, aspartic acid, glycine과 alanine이 높은 비율을 차지하고, 8개의 필수아미노산 중 threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine과 lysine은 전체 아미노산 함량 중 상당 부분을 구성하고 있다(17).

곰취는 특유의 향과 맛이 뛰어나 조선시대의 고서에서도 자주 등장할 만큼 오래전부터 즐겨오던 산나물로서 영양적인 측면에서 우수하며, 산채로서의 뿐만 아니라 한약재로도 오랫동안 사용되어져 왔다. 곰취의 기능성 및 생리활성의 연구는 곰취의 기능성을 학문적으로 규명하고, 기능성이 우수한 식재료에 대한 정보를 제공할 뿐만 아니라 곰취의 소비 증대를 촉진할 수 있을 것으로 기대한다. 따라서 본 연구는 자생하고 있는 곰취 열수 및 70% 에탄올 추출물을 제조하여 추출물의 항산화효과 및 생리활성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구의 주재료인 곰취(*Ligularia fischeri*)는 경북 영양군 일원에서 재배된 것을 구입하였으며, 모든 시료는 정상적인 녹색 빛을 띠는 것을 선별하여 흐르는 물에 3회 깨끗하게 세척한 후 물기를 제거하고 일정량으로 분취하여 초저온 냉동기(MDF-U52V, Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하면서 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

곰취 열수 추출물은 각 시료에 10배에 해당하는 3차 증류수를 각각 가한 후 85°C에서 3시간 동안 환류 추출하였고 이 과정을 3회 반복 추출하여 모아진 추출액을 여과지

(Whatman No.2)로 여과하여 제조하였다. 곰취 에탄올 추출물은 각 시료에 10배의 70% 에탄올을 가한 후 50°C에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복 추출하여 모아진 추출액을 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 제조하였다. 추출액은 회전식 감압증발 농축기(R-210, BUCHI, Kyudo, Japan)를 사용하여 감압농축하였고, 동결건조기(FD8512, Ilshin, Seoul, Korea)로 -90°C에서 동결건조한 후 플라스틱용기에 담아서 초저온냉동기에 보관하면서 시료로 사용하였다. 그리고 시료의 추출 수율은 추출 전 시료 중량에 대한 추출물의 동결건조 후의 중량 백분율로 나타내었다.

폴리페놀 측정

폴리페놀 화합물의 정량은 Folin-Denis 법(18)으로 측정하였다. 즉, 곰취 열수 및 에탄올 추출물을 10 mg/mL 농도로 증류수에 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후 여기에 0.2 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 정확히 3분 후 Na_2CO_3 포화용액 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 첨가하여 4 mL로 만든 후 실온에서 1시간 방치하여 흡수분광광도계(UV-2001, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 곰취 열수 및 에탄올 추출물에 함유된 폴리페놀 화합물 함량을 산출하였다.

플라보노이드 측정

플라보노이드 함량은 Moreno 등이 행한 방법(19)에 따라 곰취 열수 및 에탄올 추출물을 10 mg/mL 농도로 증류수에 녹인 시료 용액 0.1 mL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분간 정치 한 후 흡수분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois 등의 방법(20)에 준하여 각 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정하였다. 즉 각 추출물을 농도별로 제조한 시료 2 mL에 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 가하고, 10 초간 vortex mixing 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 분광광도계를 사용해서 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 천연 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였고, 아래와 같이 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도의 차이

를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 나타내었다.

$$\text{Electron donating ability(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : sample 첨가구의 흡광도

B : blank의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 흡광도

SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund 등의 방법(21)에 따라 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris[hydroxymethyl] amino-methane+10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하였다. 그런 다음 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 mL로 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 감소율로 산출하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도의 감소율로 아래와 같이 환산하였으며, 대조구로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{SOD like activity(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : sample의 흡광도

B : blank의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 흡광도

ABTS(ABTS radical scavenging) 라디칼 소거활성 측정

ABTS 소거활성 측정은 Re 등(22)의 방법에 따라 7.4 mM 2,2-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate) (ABTS)와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.70±0.03이 되도록 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 950 µL에 추출물 50 µL를 가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용해서 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도의 감소율로 아래와 같이 환산하였으며, 대조구 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging ability(\%)} = \left(1 - \frac{S}{C}\right) \times 100$$

S : sample의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 흡광도

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Kato 등의 방법(23)에 따라 다음과

같이 측정하였다. 즉 1 mM의 NaNO₂용액 2 mL에 각 농도의 시료 1 mL를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.1 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL를 첨가한 다음 Griess reagent 0.4 mL를 가하여 혼합시켰다. 그런 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로 나타내었다.

pH 1.2, 3.0에서 추출물의 농도에 따른 아질산염 분해 작용은 1 mM의 NaNO₂ 용액 1 mL에 각 농도의 각 추출물을 첨가하고 여기에 0.1 N HCl을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2, 3.0으로 조정 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 측정하였다. 무첨가구 L-ascorbic acid를 추출물의 농도와 동일하게 조제하여 사용하였고, 공시험은 Griess reagent 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 같은 방법으로 행하였다.

$$\text{Nitrite scavenging ability(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : sample의 흡광도

B : blank의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 흡광도

Xanthine oxidase 저해효과 측정

Xanthine oxidase 저해효과는 Stripe와 Corte의 방법(24)에 따라 측정하였다. 즉, 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 xanthine(2 mM)을 녹인 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 unit/mL) 0.1 mL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종결하였다. 그리고 반응액에 생성된 uric acid의 양을 분광광도계로 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해 효과는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. Xanthine oxidase 저해효과는 시료 첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도의 감소율로 아래와 같이 환산하였으며, 대조구로는 천연 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Xanthine oxidase inhibition(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : sample의 uric acid 생성량

B : blank의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 uric acid 생성량

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법(25)에 따라

행하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 unit/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 분광광도계로 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해효과는 시료 첨가구와 시료 무첨가구 사이의 흡광도의 감소율로 아래와 같이 환산하였으며, 대조구로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : sample의 흡광도

B : blank의 흡광도

C : control(시료 무첨가구)의 흡광도

환원력 측정

추출물의 환원력은 Wong과 Chye의 방법(26)을 일부 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 0.5 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 1 mL와 1% potassium ferricyanide 1 mL를 넣은 다음 잘 혼합하고 50°C에서 30분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 10% TCA용액 1 mL를 넣은 다음 10분간 방치하였다. 이 중 0.5 mL를 취해 증류수 1 mL와 0.1% FeCl₃ 0.5 mL를 가한 후 분광광도계로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 흡광도의 측정값으로 나타내었으며, 대조구로는 butyl hydroxy toluene(BHT, Sigma Aldrich Co.)를 사용하였다.

통계처리

Park(27)의 방법을 응용하여 모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였고, 평균±표준편차로 표시하였다. 각 실험결과는 SPSS 통계프로그램(18.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test 실시하여 p<0.05에서 유의성을 검증하고, 분석하였다.

결과 및 고찰

추출물의 수율과 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 수율 및 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 수율 측정 결과 열수 추출물은 15.23%, 에탄올 추출물은 17.45%로서 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 수율이 높았다. 곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 곰취 열수 추출물인 LWE에서 8.26±3.26 mg/g, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 17.17±4.38 mg/g으로 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 약 2배 이상 폴리페놀의 함량이 높았다. 곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량은 곰취 열수

추출물 LWE에서 15.41±8.24 mg/g, 곰취 에탄올 추출물 LEE에서 35.06±6.69 mg/g으로 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 플라보노이드 함량이 높았다.

Hong 등(28)의 연구에서 생채 야생 참취를 물과 에탄올로 추출했을 때의 폴리페놀 함량은 각각 20.43 mg/g, 16.30 mg/g이었고, 플라보노이드 함량은 열수 및 에탄올 추출물이 각각 5.40 mg/g, 8.12 mg/g으로서 본 연구 재료인 곰취의 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 참취보다 높았다. 또한 일부 약용식물 추출물에서 함유된 총 폴리페놀 함량을 측정한 Moon 등(29)이 애엽, 측백 등에 4.41-8.55 mg/g의 폴리페놀이 함유되었다는 결과와 비교하면 곰취 열수 및 에탄올 추출물에 함유된 폴리페놀 함량이 높았다.

Table 1. Yield and the contents of polyphenol and flavonoid in the extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	Yield (%)	Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)
LWE	15.23±3.46	8.26±3.26 ²⁾³⁾	15.41±8.24 ^b
LEE	17.45±2.32	17.17±4.38 ^a	35.06±6.69 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

전자공여능

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 항산화 활성 정도를 측정하고자 농도별 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여능을 측정한 결과는 Table 2와 같으며 대조구로서는 천연 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였다. 곰취의 열수 및 에탄올 추출물의 전자공여능은 농도가 증가함에 따라 전자공여능은 증가하였다. 추출물 농도 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE에서 73.48%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 77.74%로 에탄올 추출물에서 다소 높은 전자공여능을 보였으며, 대조구인 ascorbic acid에서 81.15%의 전자공여능을 보여 곰취 에탄올 추출물의 전자공여능과 큰 차이를 보이지 않았다. 62.5-125 µg/mL의 농도에서는 대조구인 ascorbic acid가 71.98-72.83%의 전자공여능을 보였고, 곰취 열수 추출물 LWE에서는 68.77-69.87%, 곰취 에탄올추출물인 LEE에서는 73.13-74.29%의 전자공여능을 보여 곰취 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 전자공여능은 높았고 대조구인 ascorbic acid보다 곰취 에탄올 추출물이 다소 높은 전자공여능을 보였다.

전자공여능은 free radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있으며, 또한 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 사용된다. 이러한 radical을 환원시키거나 상쇄하는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거 작용을 기대할 수 있어(30), 본 연구의 재료인

Table 2. Electron donating ability of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	Electron donating ability (%)				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	68.77±0.64 ^{2)bc3)}	69.87±0.21 ^c	71.83±0.34 ^b	71.78±0.21 ^c	73.48±1.08 ^c
LEE	73.13±0.66 ^a	74.29±0.59 ^a	74.59±0.71 ^a	74.94±0.68 ^b	77.74±0.97 ^b
AsA	71.98±0.35 ^a	72.83±0.16 ^b	74.99±0.21 ^a	76.79±0.69 ^a	81.15±1.08 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; AsA, ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

곰취를 활용하여 다양한 천연 소재로서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

SOD 유사활성

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정 결과는 Table 3과 같다. SOD는 체내에 존재하는 항산화 효소로서 superoxide anion을 과산화수소로 전환시켜 세포 내 super oxide anion 농도를 줄이는 중요한 역할을 담당한다. 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 SOD 유사활성능은 증가함을 보였다.

추출물 농도 1,000 µg/mL에서 곰취 열수 추출물인 LWE는 36.87%, 곰취 에탄올 추출물 LEE에서는 44.80%으로 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 SOD 유사활성능이

높았다. 62.5 µg/mL 농도에서는 대조구인 ascorbic acid가 32.21%의 SOD 유사활성능을 보였으며, 곰취 열수 추출물 LWE에서 29.03%, 곰취 에탄올 추출물 LEE에서 34.23%으로 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 SOD 유사활성능은 높았고 대조구에 비해서도 다소 높았다.

아질산염 소거능(nitrite scavenging ability)

곰취 열수 및 70% 에탄올 추출물의 아질산염 소거능을 pH 1.2와 pH 3.0에서 측정한 결과는 Table 4와 같다.

pH 1.2는 정상인의 위내 환경의 산도로 높은 값을 나타낼 수록 생체 내에서 아질산염을 소거하는 기능이 뛰어나다고 할 수 있는데 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 아질산염 소거능을 pH 1.2에서 측정한 결과 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능은 증가함을 보였

Table 3. SOD like activity of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	SOD like activity (%)				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	29.03±0.52 ^{2)bc3)}	29.53±0.42 ^c	32.84±2.23 ^c	33.92±1.12 ^c	36.87±3.04 ^c
LEE	34.23±0.37 ^a	37.32±1.34 ^a	41.67±0.96 ^{ab}	44.31±0.78 ^b	44.80±1.45 ^b
AsA	32.21±0.28 ^b	35.80±0.82 ^{ab}	43.19±1.32 ^a	50.00±0.32 ^a	62.05±1.93 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; AsA, ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. Nitrite scavenging ability of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾		Nitrite scavenging ability (%)				
		62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
pH 1.2	LWE	34.35±0.81 ^{2)bc3)}	34.10±0.62 ^c	36.31±1.65 ^c	40.22±1.20 ^c	45.02±0.90 ^c
	LEE	36.10±2.03 ^b	37.04±1.38 ^b	42.99±1.57 ^b	50.68±1.15 ^b	53.41±1.92 ^b
	AsA	43.44±0.16 ^a	44.04±5.01 ^a	55.89±0.43 ^a	61.21±1.05 ^a	64.22±1.44 ^a
pH 3.0	LWE	28.44±1.26 ^b	30.50±0.99 ^{bc}	33.94±0.33 ^b	35.81±0.99 ^c	37.16±0.86 ^c
	LEE	27.98±0.40 ^{bc}	29.05±1.26 ^b	32.34±0.27 ^c	37.55±0.54 ^b	45.31±0.82 ^b
	AsA	44.31±1.10 ^a	45.31±0.56 ^a	46.19±0.88 ^a	47.40±1.33 ^a	51.90±0.57 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; AsA, ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

다. 곰취 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE가 45.02%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE가 53.41%의 아질산염 소거능을 보여 에탄올 추출물에서 열수 추출물에 비해 높은 아질산염 소거능을 보였고, 대조구인 ascorbic acid에서 64.22%의 아질산염 소거능을 보였다. 곰취 추출물의 농도 62.5-500 µg/mL에서는 곰취 열수 추출물인 LWE에서 34.10%-40.22%의 아질산염 소거능을 보였으며, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 37.04%-50.68%의 아질산염 소거능을 보여 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 아질산염 소거능이 높았다.

곰취 열수 및 에탄올 추출물의 아질산염 소거능을 pH 3.0에서 측정한 결과 pH 1.2에서 측정한 결과와 유사하게 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능은 증가함을 보였다. 곰취 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 대조구인 ascorbic acid에서 51.90%의 아질산염 소거능을 보였고, 곰취 열수 추출물인 LWE가 37.16%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE가 45.31%의 아질산염 소거능을 보여 에탄올 추출물에서 열수 추출물에 비해 아질산염 소거능이 높았다. 곰취 추출물의 농도 62.5-500 µg/mL에서는 곰취 열수 추출물인 LWE에서 28.44%-35.81%의 아질산염 소거능을 보였으며, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 27.98-37.55%의 아질산염 소거능을 보여 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 아질산염 소거능이 높은 경향이였다. 곰취의 열수 및 에탄올 추출물에 아질산염 소거능은 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능은 증가함을 보였고, pH 1.2에서 pH 3.0보다 아질산염 소거능이 높았다. 이러한 결과는 아질산염 소거능이 pH에 매우 의존적이며 pH가 높을수록 소거 효과가 감소된다는 Kytopoulos(31)의 결과와도 일치하였다. 아질산염을 많이 포함한 식품을 다량 섭취시 nitro화 반응이 강산성인 위장에서 쉽게 일어나 발암물질을 생성하게 된다(32). 이 반응을 참고하여 본 연구의 재료인 곰취를 이용한 다양한 식품연구 개발 시 치료식품이나 약품, 항산화성이 부여된 기능성 식품 등으로 이용될 수 있을 것이다.

ABTS(ABTS radical scavenging)라디칼 소거활성 측정

곰취의 열수 및 에탄올 추출물로 ABTS 라디칼 소거활성

측정한 결과는 Table 5와 같다. 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성의 정도를 측정하고자 농도별로 ABTS라디칼 소거활성능을 측정하였다. 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE가 74.21%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 95.96%의 ABTS 라디칼 소거활성을 보였으며, 대조구인 butyl hydroxy toluene은 98.34%으로 곰취 에탄올 추출물의 경우 대조구만큼 ABTS 라디칼 소거활성이 높았다. 62.5 µg/mL의 농도에서는 곰취 열수 추출물인 LWE가 1.66%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 2.20%의 ABTS 라디칼 소거활성을 보였으며, 대조구인 butyl hydroxy toluene은 1.47%으로 곰취 에탄올 추출물의 경우 대조구보다도 ABTS 라디칼 소거활성이 높았다. 전반적으로 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성은 증가함을 보였다.

다양한 기능성 물질이 포함되어 있으며 약용, 식용으로 이용되는 오미자, 산수유, 구기자, 복분자 열수 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성이 250-1,000 µg/mL농도에서 33.43-90.49%의 보고(33)와 비교해보면 본 연구 결과에서는 곰취 열수 및 에탄올 추출물 1,000 µg/mL농도에서 74.21, 95.96%의 ABTS 라디칼 소거활성을 보인 결과와 비교해보면 곰취의 열수 및 에탄올 추출물에서도 항산화성 물질을 함유하고 있을 것으로 생각된다.

Xanthine oxidase 저해효과

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해효과를 측정한 결과는 Table 6과 같다. 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 xanthine oxidase 저해효과는 증가함을 보였다. 곰취 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE에서 61.00%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 82.35%, 대조구인 ascorbic acid는 88.67%의 xanthine oxidase 저해효과를 보여 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 xanthine oxidase 저해효과가 높았다. 125-500 µg/mL의 농도에서는 곰취 열수 추출물인 LWE에서 43.57-50.76%의 xanthine oxidase 저해효과를 보였고, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 40.74-50.33%의 xanthine oxidase 저해효과를 보여 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해효과는 유의적인 차이가 없었다. 62.5

Table 5. ABTS radical scavenging activity of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	ABTS radical scavenging activity				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	1.66±0.30 ^{2)ab3)}	2.08±0.61 ^c	3.92±0.60 ^c	16.46±0.30 ^c	74.21±0.20 ^b
LEE	2.20±0.52 ^a	3.92±0.83 ^b	12.66±0.40 ^b	62.69±0.80 ^b	95.96±0.24 ^a
BHT	1.47±0.20 ^{ab}	6.71±0.30 ^a	63.10±0.05 ^a	94.71±0.90 ^a	98.34±0.10 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; BHT, butyl hydroxy toluene.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 6. Inhibitory effect on the xanthine oxidase of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	Xanthine oxidase inhibition (%)				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	34.64±7.00 ^{2)(b)(3)}	43.57±10.20 ^b	44.44±1.94 ^b	50.76±0.75 ^b	61.00±9.21 ^b
LEE	36.82±9.49 ^b	40.74±6.36 ^b	44.44±3.83 ^b	50.33±4.90 ^b	82.35±3.39 ^a
AsA	59.04±8.28 ^a	61.22±3.42 ^a	65.58±4.06 ^a	80.17±3.29 ^a	88.67±5.47 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; AsA, ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

µg/mL의 농도에서는 곰취 열수 추출물인 LWE에서 34.64%의 xanthine oxidase 저해효과를 보였고, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 36.82%으로 곰취 열수 추출물에서 xanthine oxidase 저해효과가 다소 높았다.

Xanthine oxidase는 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 촉매작용으로 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 하기 때문에 xanthine oxidase 저해효과는 유리라디칼의 생성 억제와 함께 혈청 내에서 urea가 증가 될 시에는 통풍을 일으키므로 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다(34). 따라서 본 연구의 곰취 열수 및 에탄올 추출물에서도 xanthine oxidase 저해효과가 있어 통풍의 예방과 생약 치료제의 개발 및 이용이 가능할 것으로 생각된다.

Tyrosinase 저해 활성

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정 한 결과는 Table 7과 같다. 1,000 µg/mL의 농도에서는 대조구인 ascorbic acid에서 80.37%의 tyrosinase 저해 활성을 보였고, 곰취 열수 추출물인 LWE에서는 61.46%, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 67.72%의 tyrosinase 저해 활성을 보여 곰취 에탄올 추출물 LEE에서 곰취 열수 추출물인 LWE에 비해 tyrosinase 저해 활성이 높았다.

곰취 열수 및 에탄올 추출물 62.5-500 µg/mL 농도의 tyrosinase 저해 활성에서는 곰취 열수 추출물인 LWE에서 35.90-50.46%의 tyrosinase 저해 활성을 보였으며, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 38.27-53.75%의 tyrosinase 저해 활성을 보여 곰취 열수 추출물인 LWE보다 곰취 에탄올

추출물인 LEE에서 tyrosinase 저해 활성이 다소 높았다. 그리고 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 tyrosinase 저해 활성이 높았다.

페놀류의 함량이 높을수록 tyrosinase 저해 효과가 높다는 연구보고가 있고 식물의 여러 페놀 화합물이 tyrosinase 저해능이 있다고 밝혀진 바가 있으나(35) 모든 페놀 화합물이 tyrosinase 저해능이 있는 것은 아니다(36). 하지만 본 연구결과와 같이 곰취 열수 및 에탄올 추출물에서도 일정량의 페놀이 함유되어 있어 tyrosinase 저해 활성 효과에서도 우수한 결과를 보인 것으로 생각된다.

환원력

곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출물의 항산화 활성 정도를 측정하고자 농도별 환원력을 측정하였으며 측정 결과는 Table 8과 같으며, 대조구는 BHT를 사용하였다. 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 환원력은 증가함을 보였다. 곰취 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE와 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 1.20로 환원력이 같았다. 곰취 추출물 62.5-500 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE는 0.29-1.13의 환원력을 보였고, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서는 0.20-1.01의 환원력을 보여 곰취 열수 추출물인 LWE가 곰취 에탄올 추출물인 LEE보다 환원력이 높았다.

Osawa(37)은 phenolic compound는 가용성 식물류에 널리 분포되어 있는 것으로 항산화능을 포함하여 다양한 생물학적 효능을 나타낸다고 보고하였는데 이는 식물의 한 종류인 곰취 열수 및 에탄올 추출물에서 우수한 환원력을 보여

Table 7. Inhibitory effect on the tyrosinase of extracts from *Ligularia fischeri*

Sample ¹⁾	Tyrosinase inhibition (%)				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	35.90±0.71 ^{2)(b)(3)}	39.06±0.80 ^c	46.25±0.31 ^c	50.46±2.41 ^{bc}	61.46±6.13 ^c
LEE	38.27±1.47 ^{ab}	44.20±2.68 ^b	52.96±0.35 ^b	53.75±6.08 ^b	67.72±0.37 ^b
AsA	41.11±0.47 ^a	50.72±0.44 ^a	60.14±1.12 ^a	74.70±1.69 ^a	80.37±0.10 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; AsA, ascorbic acid.

²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.

³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 8. Reducing power of extracts from *Ligularia fischeri*

(Absorbance 700 nm)

Sample ¹⁾	Reducing power				
	62.5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL
LWE	0.29±0.01 ^{2(b3)}	0.38±0.01 ^b	0.56±0.05 ^b	1.13±0.01 ^b	1.20±0.01 ^b
LEE	0.20±0.01 ^c	0.23±0.01 ^c	0.41±0.02 ^c	1.01±0.01 ^c	1.20±0.04 ^b
BHT	0.38±0.01 ^a	0.62±0.01 ^a	0.95±0.04 ^a	1.80±0.20 ^a	1.83±0.01 ^a

¹⁾LWE, *Ligularia fischeri* water extract; LEE, *Ligularia fischeri* ethanol extract; BHT, butyl hydroxy toluene.²⁾All value are expressed as Mean±SD of triplicate determinations.³⁾Different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

다양한 식품개발에 활용 가능할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 기능성 소재 개발 가능성을 위해 곰취의 열수 및 70% 에탄올 추출방법에 따른 추출물의 항산화 및 생리활성에 대하여 연구하였다. 수율 측정 결과 곰취 열수 추출물은 15.23%, 곰취 에탄올 추출물은 17.45%로 에탄올 추출물의 수율이 높았다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 결과 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 각각 17.17±4.38 mg/g, 35.06±6.69 mg/g으로 함량이 높았다. 곰취 추출물의 전자공여능과 SOD 유사활성능, ABTS 라디칼 소거활성은 농도가 증가함에 따라 증가함을 보였으며, 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 전체적으로 높은 활성을 보였다. 아질산염 소거능은 곰취 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능은 증가함을 보였고, pH 1.2가 pH 3.0보다 아질산염 소거능이 높았다. Xanthine oxidase 저해 효과와 tyrosinase 저해 활성은 곰취 열수 및 에탄올 추출물의 모든 농도에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 특히 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 저해효과가 높았다. 환원력은 곰취 추출물 1,000 µg/mL의 농도에서 곰취 열수 추출물인 LWE와 곰취 에탄올 추출물인 LEE에서 1.20로 환원력이 유사하였고, 곰취 추출물 62.5-500 µg/mL의 농도에서는 곰취 열수 추출물인 LWE의 환원력이 높았다. 따라서 곰취의 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 및 생리활성에 대한 연구 결과 곰취가 항산화 및 생리활성이 우수하여 천연 항산화 소재로서의 활용 가능한 약용식물 자원이며, 이를 활용한 가공 산업 및 지역 특산물 발전의 기초자료가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 대구한의대학교 기린연구비(2016-901-11) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Kim KA, Jung LH, Jeon ER, Jeong JA (2005) Consciousness on the Korean traditional food of school food service dietitians. Korean J Home Econ Assoc, 43, 127-142
- Mun SH, Surh JH (2017) Effect of corn oil as an oil phase on the preparation and characterization of oil-in-water nanoemulsions fabricated by spontaneous emulsification. Korean J Food Cook Sci, 33, 427-434
- Lee KA (2017) Antioxidative and antidiabetic effects of roasted *Gugija(Lycii fructus)* extracts. Korean J Food Cook Sci, 33, 413-419
- Kang JR, Kang MJ, Shin JH, Park JH, Kim DI, Chung SY, Shin JH (2017) Antioxidant and antidiabetic activities of various solvent extracts from *Stachys sieboldii* Miq.. Korean J Food Preserv, 24, 615-622
- Kang KJ, Chung MS (1995) A Study on housewives consumption pattern and nutrition knowledge about vegetables. Korean J Dietary Culture, 10, 377-390
- Ham SS, Lee SY, Oh DH, Kim SH, Hong JK (1997) Development of beverages drinks using mountain edible herbs. J Korean Soc Food Sci Nutr, 26, 92-97
- Cho EJ (2000) A survey on the usage of wild grasses. Korean J Dietary Culture, 15, 59-68
- Ham YA, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS (2009) Component analysis and antioxidant activity of *Adenophora triphylla*. J Korean Soc Food Sci Nutri, 38, 274-279
- Whang TE, Lim HO, Lee JW (1999) Effects of fermented (*Oenanthe stolonifera* DC) extract on the activity of enzymes related to liver function of alcohol-administered rats and mice. Korean J Med Crop Sci, 7, 107-114
- Choi HJ, Chung MJ, Ham SS (2010) Antiobese and hypocholesterolemia effects of an *Adenophora triphylla* extract in HepG2 cells and high fat diet-induced obese

- mice and high fat diet-induced obese mice. *Food Chem*, 119, 437-444
11. Moon YG, Choi KS, Lee KJ, Kim KY, Heo MS (2006) Screening of antioxidant and antibacterial activity from hot water of indigenous plants, Jeju-Island. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 21, 164-169
 12. Oh DH (2011) Industry plan of wild edible greens. *Food Preservation and Processing Industry*, 10, 9-17
 13. Park BH, Kim M, Jeon ER (2013) Quality characteristics of tofu added *Ligularia fischeri* powder. *Korean J Food Culture*, 28, 495-501
 14. Chang SK, Kim JH, Oh HS (2008) The development of functional cold buckwheat noodles using biological activities of hot water extracts of *Ligularia fischeri* and *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Food Culture*, 23, 479-488
 15. Kim SM, Kang SW, Um BH (2010) Extraction conditions of radical scavenging caffeoylquinic acids from *Gomchu*(*Ligularia fischeri*) tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 399-405
 16. Cho SD, Kim GH (2005) Food product development and quality characteristics of *Ligularia fischeri* for food resources. *Korean J Food Preserv*, 12, 43-47
 17. Ahn SM, Kim MS, Jung IC, Sohn HY (2011) Antibacterial, antioxidative and anti-proliferative activity against human colorectal cell of *Pimpinella brachycarpa*. *Korean J Food Preserv*, 18, 590-596
 18. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16, 144-158
 19. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*, 71, 109-114
 20. Blois ML (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
 21. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47, 469-474
 22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, 26, 1231-1237
 23. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem*, 51, 1333-1338
 24. Stirpe F, Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 244, 3855-3863
 25. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1987) Inhibition of mushroom-Tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica*, 53, 515-517
 26. Wong JY, Chye FY (2009) Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *J Food Compos Anal*, 22, 269-277
 27. Park WP (2014) Quality characteristics of noodles added with *Houttuynia cordata* Thunb. powder. *Korean J Food Preserv*, 21, 34-39
 28. Hong JY, Kim KM, Nam HS, Shin SR (2014) Antioxidant activities of hot-water extracts from *Aster scaber* by cultivation and drying methods. *Korean J Food Preserv*, 21, 82-90
 29. Moon JS, Kim SJ, Park YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park YK, Jung ST (2004) Activities of antioxidation and alcohol dehydrogenase inhibition of methanol extracts from some medicinal herbs. *Korean J Food Preserv*, 11, 201-206
 30. Isono R, Yo shimura T, Esumi K (2005) Preparation of Au/TiO₂ nano composites and their catalytic activity for DPPH radical scavenging reaction. *J Colloid Interface Sci*, 288, 177-183
 31. Kytopoulos SA (1987) Ascorbic acid and the formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr*, 45, 1344-1350
 32. Messey RC, Crews C, Davies R, McWeeney DJ (1978) A study of the competitive nitrosations of pyrrolidine, ascorbic acid, cysteine and p-cresol in a protein-based model system. *J Sci Food Agric*, 29, 815-821
 33. Gu YR, Park HM, Jeong YS, Jung HK, Yun JH, Hong JH (2016) Physicochemical properties and antioxidant activities of hot water extracts from medicinal fruit mixture. *Korean J Food Presev*, 23, 267-274
 34. Draper HH, Bird RP (1984) Antioxidant and cancer. *J Agric Food Chem*, 32, 433-435
 35. Boissy RE, Manga P (2004) On the etiology of contact occupational vitiligo. *Pigment Cell Res*, 17, 208-214
 36. Chan EWC, Lim YY, Wong LF, Lianto FS, Wong SK, Lim KK, Joe CE, Lim TY (2008) Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem*, 109, 477-483
 37. Osawa T (1994) Novel natural antioxidants for utilization in food and biological system. *Postharvest biochemistry of plant food materials in the tropics*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 241-251