복분자 에탄올 추출물 및 분획물의 항산화 효과

강현 · 이성규

Antioxidant Capacity of Ethanol Extracts and Fractions from *Rubus coreanus* Miq.

Hyun Kang · Sung-Gyu Lee

Received: 20 December 2021 / Revised: 22 December 2021 / Accepted: 22 December 2021
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In the present study, the total polyphenol and flavonoid contents, radical scavenging ability, and reducing power of ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. were assessed in order to determine the antioxidant activity. The total polyphenol contents in the 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction were 238.46 mg gallic acid equivalents (GAE)/g and 413.59 mg GAE/g, respectively; these values were higher than those in the other fractions ($p < 0.05$). In addition, the total flavonoid content was as high as 52.83 mg quercetin equivalents (QE)/g in the ethyl acetate fraction ($p < 0.05$). With regard to DPPH and ABTS radical scavenging activities, the RC_{50} values of the ethyl acetate fraction were 3.95 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating that the scavenging activity was similar to that of ascorbic acid (control) ($p < 0.05$). Moreover, in the FRAP assay performed to assess the reducing power, the ethyl acetate fraction showed high activity ($p < 0.05$). In summary, the present findings confirmed that the ethyl acetate fraction of the *R. coreanus* Miq. 70% ethanol extract had high polyphenol and flavonoid contents and excellent antioxidant properties. Therefore, it was confirmed that the ethyl acetate fraction of the mugwort 70% ethanol extract had high polyphenol and flavonoid content and excellent antioxidant effect.

Keywords *Rubus coreanus* Miq., ethyl acetate fraction, FRAP, polyphenol, antioxidant

서론

자외선, 이온화 방사선, 화학 반응 및 대사 과정에 의해 생성되는 활성 산소종(ROS; reactive oxygen species)은 암, 관상동맥 심장 질환 및 고령화와 관련된 기타 많은 건강 문제와 관련이 있다(Liu 2000). ROS의 종류에는 superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals ($\text{OH}^{\cdot}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 있으며, hydroxyl radicals의 손상 작용은 자유 라디칼 중 가장 강한 손상이다(Marnett 2000). 항산화제는 인체 내의 산화반응을 지연 또는 감소시키는 물질이다(Halliwell 2000). 항산화제는 활성 산소 및 기타 반응성 산소종에 반응하여 산화 반응을 손상시키지 않도록 신체를 보호하고 산화 과정을 억제한다. 따라서 자유 라디칼과 관련된 질병은 항산화 효과로 예방할 수 있다.

최근 항산화제에 관한 연구는 천연에서 발생하는 식물기원의 항산화제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재 사용 가능한 합성 항산화제로는 butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), tertiary butylated hydroquinone, gallic acid esters와 같은 합성 항산화제 있지만 간 독성 및 암 발생 등의 부작용을 유발하는 것으로 보고되고 있어(Grice 1988; Wichi 1986), 이들을 대체할 수 있는 천연 항산화제 개발이 활발히 진행되고 있다. 전통적으로 차, 와인, 과일, 채소, 향신료 및 약초(예: 로즈마리)에서 추출한 천연 항산화제는 이미 항산화 첨가제 또는 건강기능성식품으로 상업적으로 이용되고 있다(Schuler 1990). 또한 새로운 항산화제를 찾기 위한 요구가 여전히 있으며, 수많은 천연 식물들이 연구되고 있다(Koleva et al. 2002). 이러한 천연 식물

H. Kang · S.-G. Lee (✉)
단국대학교 보건복지대학 임상병리학과
(Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea)
e-mail: sung-gyu@dankook.ac.kr

들의 항산화 활성은 페놀 화합물에 기인된다고 보고되고 있다(Parejo et al. 2003). 폴리페놀 화합물의 그룹 중 플라보노이드는 자유 라디칼 소거, 가수분해 및 산화 효소 억제, 항염 작용 등이 잘 알려져 있다(Cook and Samman 1996).

복분자는 장미과의 낙엽 관목으로 학명은 *Rubus coreanus* Miq.이며, 주로 한국, 중국, 일본에서 서식하며(Choi et al. 2006), gallic acid, tannin, catechin, quercetin 등의 유용한 화합물을 함유(Lee and Lee 1995)하고 있어 항암, 항산화, 콜레스테롤 저하 작용 등의 기능이 있는 것으로 보고되고 있다(Kim et al. 2006).

따라서, 본 연구에서는 복분자 열매의 에탄올 추출물과 그 분획물의 항산화 활성을 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정과 다양한 라디칼 소거활성 *in vitro* 시험을 통해 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 복분자는 충남 로컬 시장(원산지: 전북 고창)에서 구매한 복분자를 이용하여 추출물 및 분획물을 제조하여 시료로 사용하였다. 항산화 활성에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출물 및 분획물의 제조

복분자를 dry oven에 건조한 후 분쇄기로 분말화 하였다. 복분자 분말 100 g에 70% 에탄올을 원료 대비 10배수를 첨가하여 실온에서 24시간 추출을 3회 반복하였다. 추출액은 Whatman No. 1과 3 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과한 후 55°C에서 감압농축(Rotavapor R-100, Buchi, Flawil, Switzerland) 하였다. 농축한 추출물은 동

결건조(freeze drying, Vision, Daejeon, Korea)한 후 분말화하여 -70°C 초저온 냉동고(DF9010, Ilshin Bio base co., Ltd., Dongducheon, Korea)에 보관하면서 시료로 사용하였으며, 동결건조된 복분자 에탄올 추출물의 수율은 17.32%였다. 건조된 복분자 에탄올 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 water 층으로 분획하였다. 분획물도 추출물과 동일하게 감압하에 농축하고 동결건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). 분획물의 수율은 n-hexane (1.23%), chloroform (0.33%), ethyl acetate (4.58%), n-butanol (19.06%) 및 water (59.63%)로 측정되었다.

복분자 추출물 및 분획물의 폴리페놀 함량

복분자 추출물 및 분획물의 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Folin and Denis, 1912)을 응용하여 측정하였다. 1 mg/mL 각 시료용액 1 mL와 2배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Co.) 1 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 여기에 10% Na₂CO₃ (Sigma Co.) 용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 700 nm (UVIKON 922, Kontron Co., Milan, Italy)에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma Co.)를 이용하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

복분자 추출물 및 분획물의 플라보노이드 함량

복분자 추출물 및 분획물의 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno et al. (2000)의 방법을 변형하여 측정하였다. 복분자 시료 0.1 mL와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate (Sigma Co.)와 1 M potassium acetate (Sigma Co.) 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin (Sigma Co.)을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

Fig. 1. Schematic diagram of preparation of *Rubus coreanus* Miq. extract and fractions. (A) Ethanol extract preparation. (B) Fraction preparation

복분자 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능

복분자 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법에 따라 시료용액 800 μ L에 0.15 mM DPPH 용액 200 μ L를 가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 절반으로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값을 산출하여 양성 대조군인 Ascorbic acid와 비교분석 하였다.

복분자 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능

복분자 추출물 및 분획물의 ABTS 라디칼 소거능은 Re et al. (1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate (Sigma Co.)를 최종농도로 혼합(v/v)하여 실온의 어두운 곳에 24시간 동안 방치하였다. 그 후 증류수를 가하여 732 nm에서의 흡광도 값이 $0.70(\pm 0.02)$ 이 되도록 희석한 후 990 μ L를 취하여 시료용액 10 μ L를 가하고 실온에서 1분간 방치한 다음 732 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 RC_{50} 값을 산출하여 양성 대조군인 Ascorbic acid와 비교분석 하였다.

복분자 추출물 및 분획물의 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정

복분자 추출물 및 분획물의 FRAP 활성은 Benzie와 Strain의 방법(1996)을 응용하여 측정하였다. FRAP reagent는 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 용액, 20 mM $FeCl_3$ 용액을 제조하여 10:1:1의 비율로 실험 직전에 혼합하여 사용하였다. 농도별 복분자 추출물 및 분획물 10 μ L와 FRAP 시약 200 μ L를 혼합하여 섞고, 37°C에서 5분간 반응시킨 후

Miroplate Spectrophotometer (xMark™, BIO-RAD, USA) 장비를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 FRAP 수치는 0~5 mM $FeSO_4 \cdot H_2O$ 로 작성한 표준 검량 곡선에 흡광도 수치를 적용하여 구하였으며, 결과는 $FeSO_4$ eq mM/mg으로 나타내었다.

통계처리

모든 항산화 활성 분석의 데이터는 3회 분석의 평균값으로 나타내었다. 그룹 간의 통계적 유의성 분석은 통계 프로그램 SPSS statistics (ver. 25, IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 평균값의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결 과

총 폴리페놀 함량

복분자 추출물과 용매 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 gallic acid를 기준으로 측정한 결과 Figure 2와 같다. 총 폴리페놀 함량은 70% 에탄올 추출물에서 238.46 mg GAE/g 이었고, 용매 분획물에 대한 총 폴리페놀 함량은 ethyl acetate > butanol > water > hexane > chloroform 순으로 각각 413.59, 217.79, 99.46, 73.93, 및 23.42 mg GAE/g의 함량을 나타내어 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 함량을 나타냈다($p < 0.05$).

총 플라보노이드 함량

복분자 추출물과 용매 분획물에 존재하는 총 플라보노이드 함량을 quercetin을 기준으로 측정한 결과, Figure 3과 같이나

Fig 2. Total polyphenol contents in ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. Total polyphenol content, analyzed as gallic acid equivalents (GAE) mg/g of extract. Data are expressed as the means $\pm$ standard deviations ($n = 3$). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

타났다. 총 플라보노이드 함량은 70%에탄올 추출물에서 46.10 mg QE/g이었으며, 용매 분획물에 대한 총 플라보노이드 함량은 butanol>ethyl acetate>water>hexane>chloroform 순으로 각각 65.94, 52.83, 30.17, 18.83, 및 10.75 mg QE/g의 함량을 나타내어 butanol과 ethyl acetate 분획물에서 높은 함량을 나타내었으며($p < 0.05$), 총 폴리페놀 함량의 결과와 유사하게 일치하였다.

라디칼 소거능 측정

복분자 추출물과 용매 분획물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Figure 4와 같이 나타났다. DPPH 라디칼의 RC_{50} 값은 70%에탄올 추출물에서 7.82 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 용매 분획물의 RC_{50} 값은 ethyl acetate>butanol>water>hexane>chloroform의 순으로 3.95, 17.34, 22.09, 27.16, 38.29 $\mu\text{g/mL}$ 의 순으로 나타났다. 특히 ethyl acetate층은 양성대조군인 ascorbic

acid와 유사하게 측정되었다($p < 0.05$). ABTS 라디칼 소거능에서도 용매 분획물의 RC_{50} 값이 ethyl acetate>butanol>water>hexane>chloroform의 순으로 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향을 보였다. 가장 활성이 우수했던 ethyl acetate층은 RC_{50} 값이 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 으로 낮은 농도에서도 강력한 라디칼 소거능을 보였다.

FRAP (ferric reducing antioxidant power)에 의한 환원력 측정

복분자 추출물과 용매 분획물의 항산화 활성 비교를 위해 FeSO_4 검량선에 대입하여 FRAP value를 측정한 결과, Figure 5와 같았다. 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 FRAP 활성을 측정한 결과, 모든 추출물 및 분획물에서 농도의존적으로 FRAP 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 특히, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 FRAP 활성을 분석하였을 경우, 70%에탄올 추출물에

Fig. 3. Total flavonoid contents in ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. Total flavonoid content, analyzed as quercetin equivalents (QE) mg/g of extract. Data are expressed as the means $\pm$ standard deviations ($n = 3$). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

Fig. 4. DPPH radical and ABTS^+ radical scavenging activities of ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. Amount required for 50% reduction of scavenging activity. Data are expressed as the means $\pm$ standard deviations ($n = 3$). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

Fig. 5. Reducing power of ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. FRAP value, analyzed as FeSO_4 equivalents (FeSO_4E) mM/mg of extract. Data are expressed as the means $\pm$ standard deviations ($n = 3$). Different superscripts in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ using Duncan's multiple range test

서 2.54 mM $\text{FeSO}_4\text{E}/\text{mg}$ 이었으며, 분획물은 ethyl acetate>butanol>water>hexane>chloroform의 순으로 2.90, 2.37, 1.23, 1.21, 0.95 mM $\text{FeSO}_4\text{E}/\text{mg}$ 의 순으로 나타났다($p < 0.05$).

고 찰

복분자와 같은 천연소재 중에 존재하는 polyphenol 화합물은 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물의 특성으로 인해 항산화 활성을 비롯한 다양한 생리활성에 기여하는 것으로 알려져 있다(Manach et al. 2005). 특히, 폴리페놀의 한 그룹인 플라보노이드는 노란색 또는 적자색을 띠는 색소 화합물로 C6-C3-C6의 benzopyrone 기본골격을 지니고 있으며, 대부분 당과 결합된 배당체(glycoside) 형태로 존재한다. 플라보노이드는 flavones, flavonols, flavanones, flavanol 및 isoflavones로 구성되어 있으며(Hertog et al. 1992), 그 구조에 따라 분류되고 특정 flavonoid는 항염, 항노화, 항균, 항고혈압 및 항산화 등의 여러 생리적 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Rice-Evans et al. 1995). 천연식물 추출물 및 분획물에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정된 Woo et al. (2009)은 캐모마일, 각시취, 기생초 등에서 74.0 ~ 22.5 mg GAE/g의 폴리페놀 함량을 나타낸다고 보고한 결과와 비교하여 복분자 추출물의 폴리페놀 함량은 약 238.46 mg GAE/g으로 매우 높은 함량을 나타냄을 알 수 있었다. 분획물 중 주로 ethyl acetate 분획물에서 폴리페놀 및 플라보노이드 성분이 다량 추출되는데 Hwang et al. (2011)의 결과에서 미나리 ethyl acetate 분획물에서 240.61 mg GAE/g의 폴리페놀을 함유하였다는 결과와 유사하게 본 연구에서도 ethyl acetate 분획물에서 413.59 mg GAE/g의 높은 폴리페놀 함량을 확인하였다. Kim and Suh (2005)의 연구에 의하면 식물에 존재하는 페놀 화합물은 항산화활성과 연관되므로 복분자 에탄올 추출물 및 분획물은 항산화 효능을 나타내는 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물을 다량 함유하고 있어 천연 항산화제로 이용 가치가 높다고 생각된다.

DPPH와 ABTS 시약은 합성된 라디칼이지만 물과 유기용매 모두에 용해성이 높아 극성 및 비극성 테스트 시료의 항산화 활성 측정에 모두 사용이 가능하다(Awika et al. 2003). 복분자 추출물 및 분획물은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 결과와 유사하게 ethyl acetate 분획물에서 높은 radical 소거활성을 보였다(Fig. 4). 이는 Morris et al. (1986)의 연구결과와 같이 라디칼 소거능은 폴리페놀 함량과 연관성이 높다는 보고와 일치한 결과를 나타내었으며, 또한 일반적인 천연 식물 추출물에서 ethyl acetate나 n-butanol과 같은 용매 분획층에서 항산화 활성이 강하게 나타나는 경우가 많다는 Im과 Lee(2011)의 보고와 일치하였다.

FRAP은 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 항산화제에 의해 착색된 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)로 환원 정도를 측정하는 방법이다(Benzie and Strain 1996). 항산화 기전 중 환원 원리는 항산화제가 수소 원자를 공여함으로써 라디칼의 연쇄 반응을 감소시켜 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Duh et al. 1999). 복분자 추출물 및 분획물의 환원력은 라디칼 소거활성과 유사하게 ethyl acetate 분획층에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 5). 항산화능을 시험시 측정 원리와 반응 메커니즘이 다르기 때문에 항산화 효능 검정시 여러 방법을 사용하는 것을 권고하고 있으며(Patthamakanokporn et al. 2008), 라디칼 소거능과 환원 정도를 측정된 결과 복분자 ethyl acetate 분획층은 모든 항산화 테스트에서 동일하게 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

적 요

본 연구는 복분자 에탄올 추출물과 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 라디칼 소거능과 환원력을 이용한 항산화 활성 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 70% 에탄올 추출물 238.46 mg GAE/g으로 나타났으며, ethyl acetate 분획물 413.59 mg GAE/g으로 다른 분획물보다

높은 함량을 나타내었다($p<0.05$). 또한 총 플라보노이드 함량도 ethyl acetate 분획물에서 52.83 mg QE/g으로 높은 함량을 나타내었다($p<0.05$). DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능의 경우 ethyl acetate 분획물의 RC_{50} 값이 각각 3.95와 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 으로 대조군인 ascorbic acid와 유사한 소거능을 나타내었다($p<0.05$). FRAP에 의한 환원력 측정 결과에서도 ethyl acetate 분획물에서 높은 활성을 나타내었다($p<0.05$). 이상의 결과 복분자 70% 에탄올 추출물과 용매 분획물 중 ethyl acetate 분획물이 다량의 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있으며, 항산화 효과가 높게 나타났다. 따라서 본 연구의 결과는 복분자를 기능성 신소재 개발 원료로 활용하는데 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

사 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2021R1F1A1063617).

References

- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6657–6662
- Benzie IF and Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70–76
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199–1200
- Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim YS, Shin DH (2006) Alcoholic fermentation of Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *Korean Journal of Food Science and Technology* 38:543–547
- Cook NC and Samman S (1996) Flavonoids- chemistry, metabolism, cardio-protective effects, and dietary sources. Nutritional effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7:66–76
- Duh PD, Du PC, Yen GC (1999) Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* 37(11):1055–1061
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry* 12:239–249
- Grice HP (1988) Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology* 26:717–723
- Halliwell B (2000) The antioxidant paradox. *Lancet* 355:1179–1180
- Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1591–1598
- Hwang CR, Hwang IG, Kim HY, Kang TS, Kim YB, Joo SS, Lee JS, Jeong HS (2011) Antioxidant component and activity of dropwort (*Oenanthe javanica*) ethanol extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 40:316–320
- Im DY, Lee KI (2011) Antioxidative, antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 19:238–245
- Kim CJ, Suh HJ (2005) Antioxidant activities of rhubarb extracts containing phenolic compounds. *Journal of The Korean Society of Food Culture* 20:77–85
- Kim JH, Kim C, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY (2006) Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 14:206–211
- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN (2002) screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13:8–17
- Lee YA, Lee MW (1995) Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean Journal of Pharmacognosy* 26:27–30
- Liu F (2000) Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Science* 66:725–735
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:230–242
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361–370
- Morris JR, Sistrunk WA, Juneck J, Sims CA (1986) Effect of fruit maturity, juice storage, and juice extraction temperature on quality of concord grape juice. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111:742–746
- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71:109–114
- Patthamakanokpoom O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwa PP (2008) Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:241–248
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Murcia MA, Jimenez AM, Codina C (2003) Investigation of Bovilian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Science* 73:1667–1681
- 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 Biology and Medicine* 26:1231–1237

- Rice-Evans CA, Miller HJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22:375-383
- Schuler P (1990) Natural antioxidants exploited commercially. In: Hudson BJB, editor. *Food Antioxidants*. London: Elsevier. pp 99-170
- Wichi HC (1986) Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology* 24:1127-1130
- Woo JH, Shin SL, Chang YD, Lee CH (2009) Screening for antioxidant effects of aerial part extracts obtained from sixteen compositae species. *Flower Research Journal* 17:271-278