

클로로필을 제거한 영하구기엽 에탄올 추출물의 항산화 활성*

김지은¹, 배수미¹, 남유리¹, 배은영^{1,2}, 이선영^{1,2†}

¹충남대학교 식품영양학과, ²충남대학교 천연물소재융합기술센터

Antioxidant activity of ethanol extract of *Lycium barbarum*'s leaf with removal of chlorophyll*

Ji Eun Kim¹, Su Mi Bae¹, You Ree Nam¹, Eun Young Bae^{1,2} and Sun Yung Ly^{1,2†}

¹Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Convergence Research Center for Natural Products, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to estimate the antioxidant activities of 50%, 70%, and 100% ethanol extracts of *Lycium barbarum* leaf and chlorophyll removal extract. **Methods:** The antioxidant activities were estimated by measuring total polyphenol content and by assays of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfate) (ABTS) radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In addition, reactive oxygen species (ROS) production, DNA fragmentation, and antioxidant enzyme (superoxide dismutase and catalase) activities of the extracts were measured in hydrogen peroxide (H₂O₂)-stressed HepG2 cells. **Results:** The total polyphenol content, DPPH and ABTS radical scavenging activities, and FRAP value of the extracts increased in an ethanol concentration-dependent manner. The antioxidant activities of the chlorophyll-removal extracts were much higher than those of the chlorophyll-containing extracts. Cytotoxicity was not observed in HepG2 cells with extracts up to 1,000 µg/mL. All extracts inhibited ROS production in a concentration-dependent manner from 31.3 µg/mL and inhibited DNA damage at 250 µg/mL. The SOD and catalase activities of cell lines treated with the extracts and H₂O₂ were similar to those of normal cells, indicating a strong protective effect. **Conclusion:** *Lycium barbarum* leaf extracts had high antioxidant activities and protected H₂O₂-stressed HepG2 cells. Since the chlorophyll-removal extract exhibited higher antioxidant activities than the chlorophyll-containing ones and the cytoprotective effect was similar, chlorophyll removal extract of *Lycium barbarum* leaf could be developed as ingredients of functional food and cosmetics.

KEY WORDS: antioxidant, *Lycium barbarum*, HepG2 cell, chlorophyll removal

서 론

구기자 (*Lycii fructus*)는 가지과 (Solanaceae)에 속한 구기자 나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 우리나라를 비롯한 중국, 대만, 일반 등지에서 자생하거나 재배되고 있는 생약재로 한방에서는 인삼 등과 함께 독성이 없는 120종의 상약 (上藥)군으로 취급하고 있다 [1]. 구기자나무의 종류는 상당히 많으나 그 열매를 식용으로 사용하는 나무 중 잘 알려진 것으로 한국의 청양 등에서 주로 재배

되는 *Lycium chinense* Miller와 중국, 티벳, 몽고 등에서 재배되는 *Lycium barbarum* Linne (영하구기자)로 볼 수 있다 [2]. 구기자에는 carotinoid, choline, zeaxanthin, physalin (dipalmity-zeaxanthin), vitamin B₁과 meliscic acid 등의 불포화지방산과 같은 영양성분이 다량 함유되어 있고, 또한 phytochemical로서 β-sitosterol, betaine과 rutin과 같은 기능성 성분이 함유되어 있다. 이에 따라 구기자의 항암 [3], 면역증진 [4], 간 기능 개선효과 [5], 혈중 지질 저하 [6] 등의 효능에 대한 연구가 진행되었다. 구기엽의 성분으로는

Received: November 21, 2018 / Revised: December 17, 2018 / Accepted: December 28, 2018

* This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A3B03028628).

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-821-6838, e-mail: sunly@cnu.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

glutamic acid, proline, vitamin C, rutin, betaine 등과 flavonoid계 화합물들이 확인되었으며, 이와 관련된 항산화 활성에 대한 연구가 일부 진행되고 있으며 [7] 아시아 지역에서는 어린 구기업을 채취하여 채소로 활용하거나 음건하여 차로 활용하여 왔다.

클로로필은 식물체의 잎, 조류 또는 해조류의 엽록체 내에 존재하는 광합성 색소로서 녹색식물의 엽록체 속에서 빛 에너지를 흡수하여 이산화탄소를 유기화합물인 탄수화물로 동화시키는 데 쓰인다. 식물체 내에서는 클로로필 a, b, c, d 등의 다양한 형태의 클로로필이 존재하는데 이 중 클로로필 a가 녹색 식물 클로로필의 75%를 차지하는 가장 보편적인 클로로필이다 [8]. 클로로필은 인체에 흡수되었을 때 세포의 성장을 돕고 항염증 및 혈행을 돕는 등 유의한 효능을 보이는 물질로 알려져 있어 최근 녹조류 등에서 추출하여 건강기능 식품으로 이용되고 있다 [9]. 그러나 식품 가공 시 클로로필이나 리보플라빈 등의 색소 성분들은 감광제로 작용하여 공기 중의 산소로부터 triplet oxygen을 생성하고 이어서 반응성이 매우 높은 singlet oxygen을 만들므로 지질과산화물을 일으키는 등 pro-oxidant의 역할을 하게 된다 [10]. 또한 클로로필을 함유한 소재들은 식품이나 화장품, 비누 등으로 가공 시 열과 pH 등에 의하여 색상이 변화되어 소비자 만족도가 감소하는 특성을 보이므로 [11,12] 가공 시 클로로필을 제거하거나 발색을 조절하는 기술이 필요로 된다.

간은 소장에서 유입된 다양한 유해물질의 처리에 필요한 효소들을 생산하여 일차적인 해독 작용을 담당하고 있으며 [13], 간은 Reactive Oxygen Species (ROS)에 의해 공격을 받는 주요 기관이다 [14]. 산화적인 스트레스는 지질, 단백질 및 DNA 함량의 변화를 유도하고 정상적인 생물학적 기능을 조절하는 경로를 변화시키면서 간 손상을 유발시킨다. 이러한 변화는 유전자 전사, 단백질 발현, 세포 사멸 및 간성상세포 (Hepatic stellate cell) 활성화를 조절하여, 만성 바이러스성 간염, 알코올성 간질환 및 비알코올성 간염과 같은 다양한 간 질환의 시작 및 진행을 초래하는 병리학적 기전 중 하나로 간주된다 [15,16]. 또한 간질환 시 발생하는 전신으로 나타나는 산화적인 스트레스는 뇌의 장애 및 신장 장애와 같은 간 외의 장기에 손상을 일으킬 수 있다 [17]. 따라서 간기능 보호 작용을 보이는 약물들이 보고되고 있으나 대부분 부작용이 있기 때문에 비교적 부작용이 적은 식품 유래 소재의 간기능 보호 효과에 대한 연구가 진행되어 왔으며 그 대표적인 식품으로는 구기자 [5], 홍삼 [18] 등이 있다.

본 연구는 구기자나무의 부가가치를 높이기 위하여 구기엽의 활용을 증대시키기 위한 연구로 농도를 달리한 에

탄올로 추출한 구기엽 시료들의 항산화 활성을 측정하여 비교검토하고 그 중 활성이 높았던 에탄올 추출물로부터 클로로필을 제거한 구기엽 시료의 항산화 활성을 측정하여 비교 검토함으로써 건강기능식품이나 화장품 소재로의 활용가능성을 검토하고자 하였다.

연구방법

구기엽 에탄올 추출물 및 클로로필 제거 시료의 제조

구기엽 시료는 중국 Ningxia 지역에서 재배된 *Lycium barbarum*의 어린 잎을 3~4월에 채취하여 자연 건조한 것을 중국의 Zaokang Goji Berry Inc. (Yinchuan, Ningxia, China)로부터 구입하여 사용하였다. 실험실에서 건조 잎을 100g씩 계량하여 50%, 70%, 100% 에탄올을 중량의 8 배수가 되도록 첨가하고 3시간 동안 70°C에서 3회 반복 교반 추출하였다. 추출액은 여과지 (Advantec No.3, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다. 본 연구에 사용된 구기엽 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화활성을 측정하여 그 활성이 가장 높게 측정된 구기엽 100% 에탄올 추출물에서 클로로필을 제거하고 항산화능을 평가하였다. 클로로필 제거 방법을 간략하면 다음과 같다. 구기엽 에탄올 추출물을 클로로포름 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 용해시킨 후 메탄올 (Sigma-Aldrich Co.)을 섞어 색소를 침전시켰다. 그 후 charcoal column과 silica gel column chromatography를 사용하여 클로로필을 제거하였다.

추출물에서의 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis방법 [19]으로 측정하였다. 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co.) 시약과 증류수를 1:2로 섞어 암실에서 정치한 뒤 20% sodium carbonate (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich Co.) 150 μL 를 가해 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. 항산화 활성 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성은 Blois법 [20]을 이용하여 측정하였다. 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 희석한 시료에 0.15 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 섞어 가하여 암실에서 정치 후, 517 nm에서 ELISA reader (microplate absorbance spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA,

USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfate) (ABTS) radical 소거활성 측정은 Fellegrini 등 [21]의 방법으로 측정하였다. ABTS 용액은 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich Co.)-140 mM $K_2S_2O_8$ (Sigma-Aldrich Co.) 혼합용액을 absolute ethanol과 1:88 비율로 섞어 제조하였다. 농도별로 희석한 시료 10 μ L에 ABTS solution 200 μ L를 혼합하여 암소에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였다. DPPH radical 소거활성과 ABTS radical 소거활성을 농도별로 산출하여 IC₅₀값을 구하였다. 양성대조군 시료로는 ascorbic acid를 사용하였다. 추출물의 FRAP에 의한 환원력 실험은 Benzie와 Strain법 [22]으로 측정하였다. Sodium acetate buffer (pH 3.5, 300mM, Sigma-Aldrich Co.)와 10 mM TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine, Sigma-Aldrich Co.), 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich Co.)를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP reagent를 제조하였다. 농도별로 희석한 시료에 FRAP reagent 300 μ L를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 측정하였다. 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM의 농도로 제조한 표준물질 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 검량곡선에 따라 FRAP value를 얻었다.

세포배양

HepG2세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 1% penicillin- streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Victoria, Australia)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기 (BB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

구기엽 추출물의 HepG2 세포에 대한 안전성을 측정하기 위하여 water-soluble tetrazolium salts (WST)를 이용한 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 세포용액을 10⁶ cells/mL의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배양액에 0, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL 농도로 구기엽추출물을 24시간 동안 처리하였다. 배양 후 EZ-Cytox WST assay reagent (Daeil Lab Service CO., Ltd., Seoul, Korea)를 10 μ L씩 첨가하고 2시간 후에 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reactive oxygen species (ROS) 생성량 측정

HepG2세포에 구기엽 추출물을 처리하였을 때 reactive

oxygen species (ROS) 생성에 미치는 영향을 보기 위하여 96 well plate에 5 \times 10⁵ cells/mL의 농도로 세포 용액을 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 0, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL 농도의 구기엽 추출물을 20시간 처리하였다. 이후 각 well당 100 μ M H₂O₂ (hydrogen peroxide, Sigma-Aldrich Co.)를 10 μ L씩 가하여 4시간 동안 배양하면서 산화스트레스를 유발하였다. 배양 후 phosphate-buffered saline (PBS)으로 1회 세척하고 20 μ M의 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich Co.)를 각 well에 100 μ L 첨가한 다음 30분 후에 excitation 485 nm, emission 535 nm의 조건에서 DCF-DA fluorescence를 Beckman Coulter DTX 500 Multimode Detector (Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 측정하였다.

Single cell gel electrophoresis assay (Comet assay)

24 well plate에 5 \times 10⁵ cells/mL의 세포액을 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음, 구기엽 추출물들을 250 μ g/mL 농도로 첨가하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 100 μ M H₂O₂로 15분간 처리하고 다시 PBS로 3회 세척한 후 trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 HepG2 세포를 0.75% low melting agarose gel (LMA)와 섞은 후 0.5% normal melting agarose (NMA)가 미리 코팅된 슬라이드에 분산시켰다. 그 후 슬라이드를 alkaline lysis buffer (2.5 M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris, 1% Triton-X100)에서 1시간, electrophoresis buffer (300mM NaOH, 10mM Na₂EDTA)에서 40분 동안 침지시키고, 전기영동을 실시하였다. DNA는 20 μ g/mL ethidium bromide로 염색하여 light microscopes (DM 2000, Leica Co., Wetamar, German)을 이용하여 관찰하였다. 슬라이드 당 DNA를 50개씩 읽었으며 Comet 5.5 image analyzing system (Andor Co., Nottingham, UK)으로 분석하였다.

항산화 효소활성 측정

구기엽 추출물 처리에 따른 세포 내 항산화효소의 활성을 보기 위하여 superoxide dimutase (SOD)와 catalase활성을 측정하였다. Well plate에 10⁶ cells/mL농도의 세포용액을 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한 다음, 구기엽추출물들을 500 μ g/mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후, 100 μ M H₂O₂로 30분간 처리하고 다시 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 수거하여 lysis buffer (0.1 M Tris/HCl, pH 7.4

containing 0.5% triton X-100, 5 mM β -Me, 0.1 mg/mL phenylmethane sulfonyl fluoride) 200 μ L를 넣은 후 3분간 초음파 처리하여 균질화하였다. SOD활성은 세포액을 14,000 g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 SOD activity assay kit (Biovision Inc., Milpitas, CA, USA)를 사용하여 제조회사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. Catalase 활성은 균질화한 세포액을 1,000 g에서 15 분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 catalase activity colorimetric/flourometric assay kit (Biovision Inc., Milpitas, CA, USA)를 사용하여 제조회사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

통계처리

SPSS (SPSS Statistics 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 통계처리를 하였으며, 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 군간의 평균값의 차이에 대한 유의성 검증은 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA) 과 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 이용하여 $\alpha = 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결 과

구기엽 추출물의 수율, 클로로필 및 총 폴리페놀 함량

본 연구에서 사용한 방법으로 클로로필을 제거하였을 때 그 제거율을 보기 위하여 100% 에탄올 추출물과 이로부터 클로로필을 제거한 시료의 클로로필 a 함량을 측정 한 결과, 클로로필 a가 99.9% 제거된 것으로 확인되었다 (Table 1). 100% 에탄올 추출물의 수율은 20.5%이었으며, 클로로필 제거 100% 에탄올 추출물의 수율은 16.4%로 클로로필을 제거로 인해 수율이 20% 감소하였다. 또한 50%, 70%, 100%의 에탄올로 추출한 구기엽 추출물 (LL50, LL70, LL100)과 구기엽 100% 에탄올 추출물에서 클로로필을 제거한 시료 (LL100 Ch-)의 폴리페놀 함량을 측정한

Table 1. Chlorophyll a and total polyphenol contents of *Lycium barbarum's* leaf extracts

Group ¹⁾	Yield (%)	Chlorophyll a (μ g/kg)	Total polyphenol (mg GAE ²⁾ /extract g)
LL 50	-	-	63.94 \pm 7.72 ^{a3)4)}
LL 70	-	-	62.60 \pm 5.57 ^a
LL 100	20.5	1,194.6	140.51 \pm 7.45 ^b
LL 100 Ch-	16.4	1.7	312.89 \pm 10.2 ^c

1) LL 50, 70, 100: *Lycium barbarum's* leaf extracted with 50, 70 and 100% ethanol, respectively; Ch-: extract with chlorophyll removal

2) GAE: gallic acid equivalent

3) mean \pm SD (n = 3)

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

결과, LL100의 총 폴리페놀 함량은 140.51 \pm 7.45 mg GAE/g로 LL70의 62.60 \pm 5.57 mg GAE/g이나 LL50의 64.74 \pm 7.72 mg GAE/g에 비해 유의하게 높았고 LL100 Ch-의 폴리페놀함량은 312.89 \pm 10.21 mg GAE/g로 LL100의 폴리페놀 함량에 대비하여 2배 이상 높았다.

구기엽 추출물의 항산화 활성

구기엽 추출물들과 클로로필 제거 구기엽 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, LL50, LL70, LL100군들의 IC50값은 각각 1.01 \pm 0.01 mg/mL, 0.82 \pm 0.03 mg/mL, 0.34 \pm 0.02 mg/mL였고 LL100 Ch-군의 IC 50값은 0.14 \pm 0.05 mg/mL로 추출용매의 알코올 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거능은 높아졌으며 클로로필을 제거한 시료의 DPPH radical 소거활성은 클로로필 제거 하지 않은 시료에 비해 2배 이상 높았다. 동일한 방법으로 측정한 ascorbic acid IC50값은 0.08 \pm 0.00 mg/mL으로 클로로필 제거 시료는 ascorbic acid의 57% 수준이었다. ABTS radical 소거활성을 측정한 결과 LL50, LL70, LL100군들의 IC50값은 각각 0.55 \pm 0.01 mg/mL, 0.49 \pm 0.00 mg/mL, 0.27 \pm 0.00 mg/mL이었다. LL100 Ch-군의 IC50값은 0.08

Table 2. Antioxidant capacities of *Lycium barbarum's* leaf extracts

Group ¹⁾	IC50 (mg/mL) ²⁾		FRAP value (mmol Fe (II)/100g)
	DPPH	ABTS	
LL 50	1.01 \pm 0.07 ^{c3)4)}	0.55 \pm 0.01 ^c	0.15 \pm 0.01 ^a
LL 70	0.82 \pm 0.03 ^c	0.49 \pm 0.00 ^c	0.16 \pm 0.00 ^a
LL 100	0.34 \pm 0.02 ^b	0.27 \pm 0.00 ^b	0.37 \pm 0.01 ^b
LL 100 Ch-	0.14 \pm 0.05 ^a	0.08 \pm 0.05 ^a	1.28 \pm 0.08 ^c
Ascorbic acid	0.08 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	

1) LL 50, 70, 100: *Lycium barbarum's* leaf extracted with 50, 70 and 100% ethanol, respectively; Ch-: chlorophyll removal extract

2) The concentration in mg/mL required for 50% reduction of DPPH and ABTS radical.

3) mean \pm SD (n = 3)

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

± 0.05 mg/mL로 클로로필 제거 전에 비하여 ABTS radical 소거활성이 약 3배 이상 증가하였고 이는 ascorbic acid (IC₅₀ 값, 0.02 ± 0.00 mg/mL)의 25% 수준이었다. 시료의 FRAP value를 측정한 결과 LL50, LL70, LL100군들에서 각각 0.15 ± 0.01 mM, 0.16 ± 0.01 mM, 0.37 ± 0.01 mM였으며, LL100 Ch-군의 FRAP value는 1.28 ± 0.08 mM로 클로로필 제거 전에 비하여 유의하게 높았다.

구기엽 추출물의 HepG2 세포에 대한 안전성

HepG2 세포에서 구기엽 추출물들의 생리활성을 보기 위하여 선행연구로 세포에 대한 구기엽 추출물들의 안전성을 검토하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. LL50, LL70, LL100, LL100 Ch- 등 구기엽 추출물들은 모두 1,000 μ g/mL의 농도까지 세포 생존율에 영향을 주지 않아 독성이 없는 것으로 확인되었다.

ROS 생성 억제 효과

HepG2세포에서 ROS 생성량을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. H₂O₂를 처리하여 산화 스트레스를 유도한 세포는 정상세포에 비해 ROS 생성량이 14% 증가하였다.

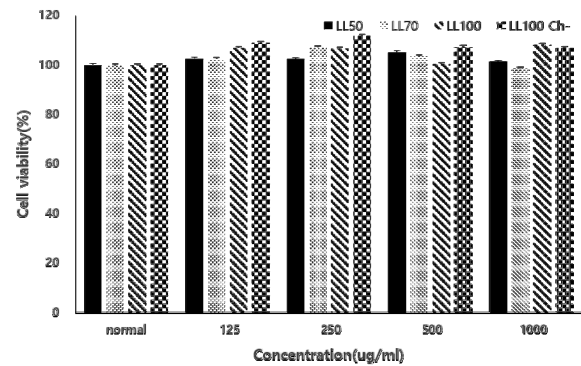


Fig. 1. Effect of the *Lycium barbarum* leaf's ethanol extracts (LL50, LL70, LL100, LL100 Ch-) on HepG2 cell viability. LL 50, 70 and 100: *Lycium barbarum*'s leaf extracted with 50, 70 and 100% ethanol, respectively; Group LL100 Ch-: chlorophyll removal ethanol extract. Values are mean \pm standard deviation of three replicate determinations ($n = 3$). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

LL50, LL70, LL100, LL100 Ch-를 H₂O₂와 함께 처리한 경우 H₂O₂ 단독처리군에 비해 낮아졌는데, LL50군의 ROS 생성량은 15.6 μ g/mL의 저농도부터 유의하게 감소하였으며 1,000 μ g/mL 농도에서는 H₂O₂ 단독처리군에 비해

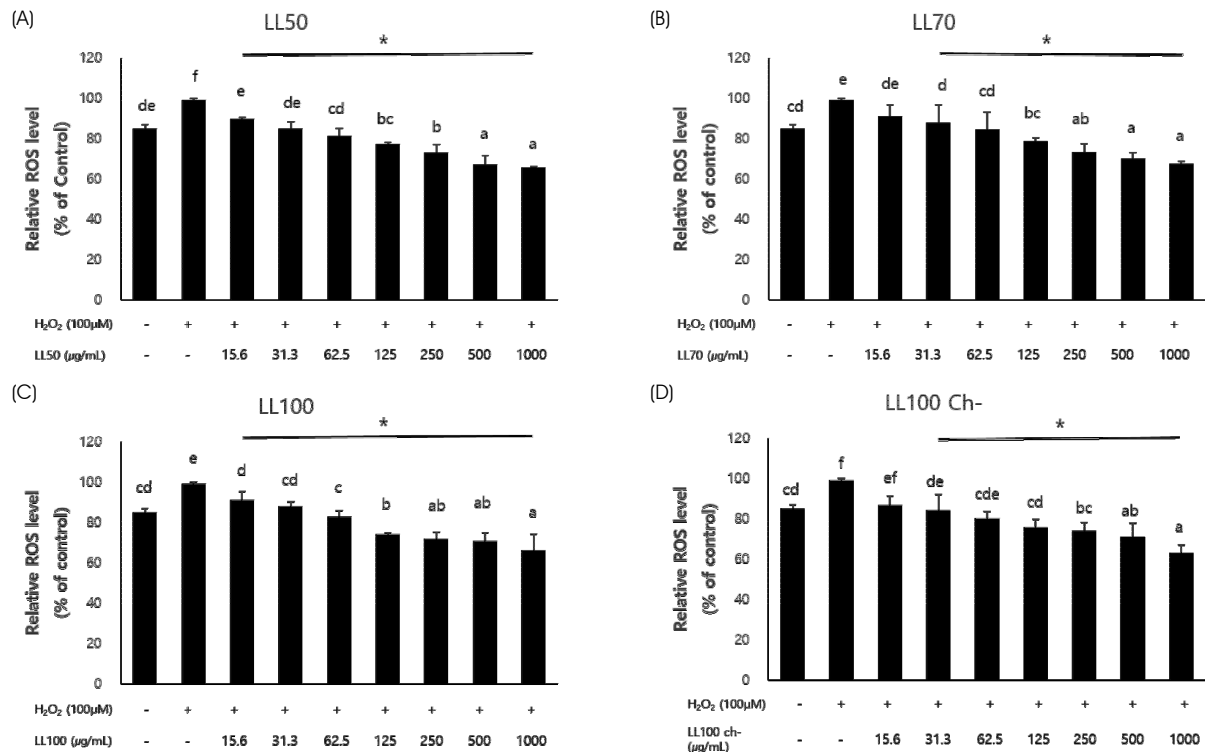


Fig. 2. Effects of (A) 50% ethanol extracts, (B) 70% ethanol extract, (C) 100% ethanol extract of *Lycium barbarum*'s leaf and (D) chlorophyll removal extract with 100% ethanol from *Lycium barbarum*'s leaf on the production of intracellular ROS level in H₂O₂-treated HepG2 cells. Values are mean \pm SD of three replicate determinations ($n = 3$). Different superscripts (a-c) in a column indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test (*: $p < 0.05$, compared to treated only H₂O₂).

ROS 생성량이 34% 감소되었다 ($p < 0.05$). LL70군에서는 31.3 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터, LL100군에서는 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 유의하게 ROS 생성량이 감소하였으며 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 H_2O_2 단독처리군에 비해 ROS 생성은 각각 32%와 33% 감소하였다 ($p < 0.05$). LL100 Ch- 처리군에서는 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 ROS 생성량이 유의하게 감소하였으며 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 H_2O_2 단독처리군에 비해 36%정도 ROS 생성량이 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한 LL50과 LL100 군들은 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터, LL70과 LL100 Ch- 군들은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도부터 모두 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 정상세포군에서 보다 유의하게 낮은 ROS 생성량을 보여주었다 ($p < 0.05$).

DNA의 산화적 손상 보호 효과

구기엽 추출물들이 H_2O_2 처리에 따른 HepG2 cell의 DNA 손상을 보호할 수 있는지 알아보기 위하여 single cell gel electrophoresis assay (Comet assay)를 실시한 결과는 Table 3에 나타내었다. 위의 ROS 생성 억제 효과 실험 결과, 모든 군에서 추출물의 농도 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 부터 유의한 차이를 보였으므로 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 최고 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 중간 값인 250 $\mu\text{g/mL}$ 로 세포에 추출물을 처리하여 DNA 손상에 미치는 효과를 검토하였다. HepG2 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 때 정상세포군에 비하여 tail DNA는 31.6 %, tail length는 51%, tail moment는 71.1% 증가하였다 ($p < 0.05$). LL50 처리군에서 tail DNA는 H_2O_2 단독처리군과 비슷하였으나, tail length는 36%, tail moment는 46% 감소하였다. LL70 처리군은 H_2O_2 단독처리군에 비해 tail DNA가 28.5%, tail length는 26.8%, tail moment는 44.3% 감소하였다. H_2O_2 단독처리군에 비해 LL100군의 tail DNA, tail length, tail moment는 각각 42%, 29.2%, 49.5% 감소하였으며 LL100 Ch-군의 경우 각각 23.5%, 31.6%, 55% 감소하였다. 그러나 추출 용매의 농도에 따른 차이나 LL100 군과 LL100 Ch-군간의 차이는 관찰되지 않았다.

Table 3. Levels of DNA damage expressed as tail DNA, tail length, and tail moment in HepG2 cells with or without *Lycium barbarum*'s leaf extracts

Group ¹⁾	Tail DNA (%)	Tail length (μm)	Tail moment
Normal	10.35 \pm 0.85 ^{2)a3)}	7.64 \pm 1.10 ^a	1.27 \pm 0.35 ^a
Control	15.14 \pm 1.17 ^b	15.13 \pm 1.89 ^b	4.40 \pm 0.91 ^b
LL 50	14.06 \pm 1.05 ^b	9.55 \pm 1.14 ^a	2.37 \pm 0.42 ^a
LL 70	10.81 \pm 0.95 ^a	11.07 \pm 1.38 ^a	2.45 \pm 0.57 ^a
LL 100	8.78 \pm 0.80 ^a	10.71 \pm 1.80 ^a	2.22 \pm 0.65 ^a
LL 100 Ch-	11.58 \pm 0.87 ^a	10.34 \pm 1.14 ^a	1.98 \pm 0.36 ^a

1) LL 50, 70, 100: *Lycium barbarum*'s leaf extracted with 50, 70 and 100% ethanol, respectively; Ch-: chlorophyll removal extract

2) mean \pm SD

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

항산화 효소활성

H_2O_2 처리로 산화적 스트레스를 유발한 HepG2 cell에서 구기엽 시료들의 항산화 효과를 확인하기 위해 SOD 활성과 catalase 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. SOD 활성을 측정된 결과, 정상대조군 (14.84 \pm 0.45 U/mL)에 비해 H_2O_2 단독처리군의 SOD 활성 (5.57 \pm 1.68 U/mL)은 60% 정도 낮아졌으며, 구기엽 시료를 병행처리한 모든 군의 SOD 활성은 정상대조군과 차이가 없는 정도로 증가하였다 (LL50, LL70, LL100, LL100 Ch- 군 각각 15.57 \pm 0.53 U/mL, 15.41 \pm 0.54 U/mL, 15.49 \pm 0.63 U/mL, 15.41 \pm 0.43 U/mL, $p < 0.05$). 또한 구기엽 추출물을 처리한 각 군 간의 차이는 보이지 않았으며 클로로필 제거 전후의 차이도 보이지 않았다. Catalase 활성을 측정된 결과, 정상대조군 (271.18 \pm 19.35 nmol/min/mL)에 비해 H_2O_2 단독처리군의 catalase 활성 (191.51 \pm 26.98 nmol/min/mL)이 29% 낮아졌으며, 구기엽 추출물을 함께 처리한 모든 군에서 catalase 활성이 유의하게 높아졌다 (LL50, LL70, LL100, LL100 Ch- 군 각각 325.18 \pm 32.27 nmol/min/mL, 324.51 \pm 35.60 nmol/min/mL, 292.29 \pm 22.72 nmol/min/mL, 252.07 \pm 41.22 nmol/min/mL, $p < 0.05$). 또한 LL50군과

Table 4. Effects of *Lycium barbarum*'s leaf extracts on the antioxidant enzyme activities in HepG2 cells

Group ¹⁾	SOD (U/mL)	Catalase (nmol/min/mL)
Normal	14.84 \pm 0.45 ^{2)a3)}	271.18 \pm 19.35 ^{ab}
Control	5.57 \pm 1.68 ^b	191.51 \pm 26.98 ^c
LL50	15.57 \pm 0.53 ^a	325.18 \pm 32.27 ^a
LL70	15.41 \pm 0.54 ^a	324.51 \pm 35.60 ^a
LL100	15.49 \pm 0.63 ^a	292.29 \pm 22.72 ^{ab}
LL100 Ch-	15.41 \pm 0.43 ^a	252.07 \pm 41.22 ^b

1) LL 50, 70, 100: *Lycium barbarum*'s leaf extracted with 50, 70 and 100% ethanol, respectively; Ch-: chlorophyll removal extract

2) mean \pm SD

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

LL70군의 catalase 활성은 정상대조군보다 유의하게 더 높았으며, LL100과 LL100 Ch-는 정상대조군과 비슷한 수준이었다.

고 찰

구기자나무의 부가가치를 높이고자 구기엽의 활용가능성을 검토하고 또한 구기엽을 소재화할 때 일부 바람직하지 않은 영향을 보이고 있는 엽록소를 제거한 후 생리활성들이 유지되는지를 검토하고자 각 추출물들의 항산화와 효능을 우선 검토하였다. 그 결과 전반적으로 50%나 70% 에탄올 추출물에 비하여 100% 에탄올 추출물의 항산화 효능이 높았으며 클로로필을 제거한 시료가 제거 전 시료에 비하여 항산화 효능이 높았다. 천연물 소재의 항산화 효능은 함유되어있는 여러가지 성분에 의존하지만 특히 폴리페놀의 함량과 관계가 있다 [23]. 본 연구에서 추출물들의 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 에탄올 50%와 70%로 추출한 시료들의 총폴리페놀 함량은 100% 에탄올 추출물에 비하여 낮았다. 유사한 다른 연구를 살펴보면 Liu 등 [24] 구기엽 80% 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량은 $92.19 \pm 3.20\text{mg GAE/g}$ 로 보고하여 본 연구결과의 70% 에탄올 추출물 보다는 높았으나 100% 에탄올 추출물보다는 낮은 결과를 알 수 있었다. 클로로필이 제거된 시료의 총 폴리페놀 함량은 제거하기 전에 비해 월등히 높았는데 그 이유로는 수율에서 볼 수 있듯이 폴리페놀의 농축에 의한 효과가 일부 기여했을 것으로 사료된다. 녹색 식물에서 클로로필의 제거를 위한 시도와 이에 따른 항산화능에 대한 연구는 기존에 몇 건 수행되었는데 대부분 클로로필 제거 전 시료가 제거 후 시료에 비하여 항산화 효능이 감소되는 것으로 보고되고 있다 [25-27]. Benjakul 등 [28] *Leucaena leucocephala* 종자의 물 추출물 제조 시 클로로필 제거 여부에 따라 폴리페놀 함량이 달라지는지를 비교하였는데 이 연구에서는 클로로필 제거 후 ($43.1 \pm 0.06 \text{ g GA/100g}$) 시료의 폴리페놀 함량이 제거 전 ($56.2 \pm 0.01 \text{ g GA/100g}$) 시료에 비하여 더 낮게 나타났다. 그러나 이에 따른 항산화 효능의 차이는 크지 않았는데 이러한 결과는 클로로필 제거 시 사용한 용매, 클로로포름에 의해 일부 극성이 낮으며 항산화능은 크지 않은 페놀 화합물들이 함께 제거되었기 때문이라고 저자들은 설명하고 있다. 본 연구에서는 구기엽을 에탄올로 추출한 후 추출물에서 클로로필을 제거하는 방법을 사용하였으며 클로로필 제거 방법도 클로로포름에 의한 단회 추출이 아닌 다단계 방법을 적용하였기 때문에 Benjakul 등 [28]의 연구 결과와는 차이가 있을 것으로 사료된다. 또한 시료 종류의 차이에 따른 성분의

차이도 다른 결과를 도출하는 원인이 될 수 있다. 그러므로 추후 후속 연구들을 통하여 본 연구에서 사용한 클로로필 제거 방법에 따른 시료의 폴리페놀 함량의 증가 요인을 검증하여야할 것으로 생각된다.

구기엽 추출물들의 DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, FRAP value는 일관성 있게 추출용매의 알코올 농도가 높을수록 증가하였고 클로로필 제거 시료가 제거 전 시료에 비하여 월등히 높았다. 이러한 결과는 위에서 설명한대로 총폴리페놀 함량의 증가와 관련이 있을 것으로 사료된다. LL100군의 DPPH radical과 ABTS radical 소거능은 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 대비 각각 24%와 7% 수준이었으나 클로로필 제거 후 각각 57%, 25% 수준으로 증가하였다. Khalaf 등 [29]은 약용식물들의 메탄올 추출물의 DPPH 소거능을 ascorbic acid와 비교한 결과 IC50값이 ascorbic acid보다 높은 것 (*Camellia sinesis* Linn.)부터 1.3% 수준에 불과한 것 (*Elettaria cardamomum* (Linn.) Maton)까지 다양하다고 보고하였으며 인도 Assam지역에서 자생하고 있는 네 가지 약용 식물의 추출물들의 경우 항산화능이 가장 높았던 *Clerodendrum viscosum*의 경우도 ascorbic acid의 약 20% 정도로 측정되어 [30] 본 연구에서 측정된 클로로필 제거 구기엽의 항산화능은 천연물로서는 상당히 높은 항산화능을 보이고 있다.

Leucaena leucocephala 종자를 대상으로 한 Benjakul 등 [31]의 연구에서는 클로로필을 제거한 후 추출한 시료의 총 페놀함량은 감소하였지만 DPPH radical 소거활성과 ABTS radical 소거활성, FRAP value, metal chelating activity 등의 항산화능은 증가한 것으로 보고하고 있다. 클로로필은 그 종류와 화학적 성상에 따라 항산화능이 다르게 나타나고 있으며 특히 포피린링 안의 금속이온은 항산화능을 결정하는 주요 요인으로 보고되었다 [32]. Benjakul 등 [31]은 클로로필 제거 과정에서 metal chelating activity를 보유한 페놀성 화합물들이 더 농축된 것을 입증하였다. 또한 Sánchez-González 등 [33]은 시료 내 폴리페놀의 함량과 FRAP value간의 높은 상관관계를 가지고 있다고 보고하여 본 연구결과를 뒷받침하고 있다. 한편, 시료로부터 클로로필 제거에 따른 항산화능의 변화는 다른 측면을 고려할 수 있다. Albishi 등 [34]에 따르면 클로로필 및 그 유도체들은 빛의 유무에 따라 산화촉진이나 항산화 특성의 양면성을 보이고 있다. 즉, 클로로필과 그 파생물들은 빛이 존재하지 않을 때에는 항산화물질로서 작용을 하지만, 빛이 있을 때에는 산화촉진제로 작용을 하게 된다. 따라서 클로로필을 제거하게 되면 시료의 항산화능 측정 시 클로로필에 의한 간섭효과를 줄일 수 있다고 하였

다. 그러나 녹색채소의 잎에서도 클로로필의 함량은 1%를 넘지 못하기 때문에 [35] 클로로필 제거로 인한 항산화능의 발현은 미미할 것으로 사료되며 이 사실이 본 연구에서 사용한 클로로필 제거 시료의 항산화능이 증가된 것을 충분히 설명하지는 못한다. 오히려 주요요인은 앞서 설명한 것처럼 클로로필 제거에 따른 폴리페놀 농도의 증가로 볼 수 있다.

본 연구에서는 추출물의 항산화능을 확인한 후 세포수준에서 항산화능이 발현 되는지를 살펴 보고자 하였다. 간은 인체에서 해독 작용을 하는 기관으로 ROS에 의한 공격을 가장 많이 받는 기관 중 하나로 알려져 있다. 따라서 인간 간암세포주인 HepG2 cell을 대상으로 추출물들의 항산화능을 검토하였다. 본 연구에 사용한 추출물들은 모두 에탄올로 추출하였고 실험 결과 1,000 µg/mL까지 세포증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 전통의학에서는 폴리페놀류를 다량 함유하고 있어 항산화능이 높은 식물들을 치료제로 사용하여 왔지만 고농도로 사용하게 될 때 유해할 수 있음을 경고하고 있다 [36]. 따라서 본 연구 소재와 같이 항산화능이 유지되면서도 비교적 고농도까지 세포독성을 보이지 않는 식물 추출물들이 건강기능식품이나 화장품의 소재로 개발되기에 적합하다고 볼 수 있다.

HepG2 cell에서 추출물들의 ROS 생성량의 억제효과와 DNA 보호효능이 있는지를 실험한 결과, 모든 추출물들이 31.3 µg/mL부터 농도의존적으로 ROS의 생성을 억제하는 효과를 보여주었으며 250 µg/mL의 농도로 배양액에 처리하였을 때 DNA 손상으로부터 세포를 보호하는 효과를 보여주었다. Qi 등 [37]은 SRA01/04 cell에 구기자 다당체 400mg/L를 처리한 결과, ROS 및 산화적인 스트레스의 수준이 약 30%정도 유의하게 감소되었다고 하였는데 본 연구결과, 구기엽에서도 구기자 다당체와 유사한 효능을 보여주고 있었다. Ceccarini 등 [38]은 구기자 분말 시료를 HepG2 cell에 처리하였을 때 세포의 DNA 손상을 29.3% 정도 줄일 수 있다고 보고하였고 이 결과는 구기자 분말이 간 세포를 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있음을 뜻한다. 본 연구결과, 구기엽 역시 구기자 분말이나 다당체와 유사한 효과를 보여주었으며 클로로필 제거 구기엽은 제거 전 구기엽 시료와 유사한 항산화능을 보이고 있었다. 추출물에서 직접 측정된 항산화능은 클로로필 제거 시료가 제거전 시료에 비하여 우수한 항산화 효과를 보여주었으나 HepG2 cell 실험에서는 차이를 확인할 수 없었다. 또한 세포가 분비하는 항산화 효소인 SOD와 catalase를 측정한 결과, H₂O₂로 산화적 스트레스를 준 세포에서는 현저하게 효소활성이 저하되었지만 추출물들을 처리한 세포군에서는 SOD 활성이 정상세포군의 수준으로 증가하여

강력한 보호효과를 보여주었다. Catalase 활성도 유사한 결과를 보여주었으나 LL50과 LL70군에서는 정상세포군에 비하여 catalase의 활성이 더 높아졌다. 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 산화적 스트레스에 의해 세포 내에서 과잉 생성되는 O₂⁻를 H₂O₂와 산소로 변화시키며, catalase는 H₂O₂를 산소와 물로 변환시키는 역할을 통해 세포 내 radical을 소거함으로써 산화적 스트레스를 보호하는 것으로 알려져 있다 [39]. 산화적인 스트레스로부터 세포 및 조직을 보호하는데 있어서 catalase의 역할은 광범위하게 연구되어 왔는데, 특히 사람의 기관지 상피세포에서의 catalase는 H₂O₂의 독성 및 산화제에 의한 중독에 대한 내성이 강한 효소로 보고되었다 [40]. Catalase의 활성은 조직의 종류에 따라 다르지만, 간에서는 H₂O₂를 제거하는 능력이 탁월하여 간세포에서 catalase 활성이 매우 높게 나타난다고 하였다 [41].

본 연구에서 사용한 구기엽 에탄올 추출물들은 항산화능이 높으며 고농도까지 세포독성을 보이지 않고 H₂O₂에 의해 손상된 간세포를 보호할 수 있는 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 추출 용매의 알코올 농도가 높을수록 추출물의 항산화능은 증가하였고 특히 클로로필 제거 구기엽 에탄올 추출물은 클로로필을 제거하지 않은 구기엽 에탄올 추출물보다 시료의 항산화능이 높고 세포독성과 세포보호 효과가 유사하게 나타나 건강기능식품이나 화장품의 소재로 활용하기에 적절한 소재로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 구기엽의 항산화 활성을 확인하고자 50%, 70%, 100% 에탄올 추출물과 100% 에탄올 추출물에서 클로로필을 제거한 시료를 포함하여 총 4종 시료의 항산화 활성을 비교하였다. 항산화능을 측정하기 위하여 총 폴리페놀 함량, DPPH와 ABTS radicals 소거능, FRAP assay를 통해 시료의 항산화능을 평가하였다. 또한 H₂O₂ 처리로 산화적 스트레스를 유발한 HepG2세포주에서 추출물들이 세포보호 효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위하여 ROS 생성, DNA fragmentation, 세포의 항산화효소활성 (SOD와 catalase)을 측정하였다. 연구결과, 총 폴리페놀 함량, DPPH와 ABTS radicals 소거능, 그리고 FRAP value에서 모두 추출용매의 알코올 농도가 높을수록 증가하였고 클로로필 제거 시료가 제거 전 시료에 비하여 월등히 높았다 ($p < 0.05$). HepG2세포에서 세포독성을 확인한 결과 모든 시료에서 1,000 µg/mL까지 세포독성을 유발하지 않았다. 모든 추출물들은 31.3 µg/mL 농도부터 H₂O₂에 의해 증가한 ROS생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 효과를 보

였다 ($p < 0.05$). 모든 추출물은 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 배양액에 처리하였을 때 세포의 DNA 손상을 억제하는 효과를 보여주었다 ($p < 0.05$). 또한 H_2O_2 처리한 세포에 비하여 추출물들을 함께 처리한 세포군의 SOD와 catalase 활성은 정상세포와 유사한 수준으로 강력한 보호효과를 보여주었다. 결론적으로 본 연구에서 사용한 구기엽 에탄올 추출물들은 항산화능이 높으며 고농도까지 세포독성을 보이지 않고 H_2O_2 에 의해 손상된 간세포를 보호할 수 있는 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 클로로필 제거 구기엽 에탄올 추출물은 항산화능이 높고 세포독성과 세포보호 효과가 클로로필 제거전 구기엽 에탄올 추출물과 유사하게 나타나 건강기능식품이나 화장품의 소재로 활용하기에 적절한 소재로 생각된다.

ORCID

김지은: <https://orcid.org/0000-0002-2789-7853>

배수미: <https://orcid.org/0000-0002-3022-6954>

남유리: <https://orcid.org/0000-0002-1258-4467>

배은영: <https://orcid.org/0000-0003-1844-1296>

이선영: <https://orcid.org/0000-0001-6813-8573>

References

1. Lee BC, Park JS, Kwak TS, Moon CS. Variation of chemical properties in collected boxthorn varieties. *Korean J Breed* 1998; 30(3): 267-272.
2. Kwon KD, Park WJ, Kim SA. Buy decision making factors and marketing strategies of *Lycium chinense*: focused on Cheongyang region. *Korean J Agric Manage Policy* 2007; 34(2): 422-443.
3. Park YJ, Kim M, Bae SJ. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Lycii fructus* with vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2002; 31(1): 143-148.
4. Park JS, Park JD, Lee BC, Choi KJ, Ra SW, Chang KW. Effects of extracts from various parts of *Lycium chinense* Mill. on proliferation of mouse spleen cells. *Korean J Med Crop Sci* 2000; 8(4): 291-296.
5. Kang K, Jung J, Koh KH, Lee CH. Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* mill fruit extracts and fresh fruit juice. *Korean J Food Sci Technol* 2006; 38(1): 99-103.
6. Sung SH, Park SH. Effect of *Lycii Fructus* powder on lipid metabolism in 1% cholesterol fed rats. *Korean J Food Cult* 2008; 23(4): 521-528.
7. Kim TS, Park WJ, Ko SB, Kang MH. Development of extracts of *Lycii folium* having high antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37(10): 1318-1322.
8. Chernomorsky SA, Segelman AB. Biological activities of chlorophyll derivatives. *N J Med* 1988; 85(8): 669-673.
9. Solymosi K, Mysliwa-Kurdiel B. Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. *Mini Rev Med Chem* 2017; 17(13): 1194-1222.
10. Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J Phys Chem B* 2005; 109(18): 8570-8573.
11. Nurhayati N, Suendo V. Isolation of chlorophyll a from spinach leaves and modification of center ion with Zn^{2+} : study on its optical stability. *Matematika Sains*, 2011; 16(2): 65-70.
12. Özkan G, Ersus Bilek S. Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chem* 2015; 176: 152-157.
13. Tanielian C, Wolff C. Mechanism of physical quenching of singlet molecular oxygen by chlorophylls and related compounds of biological interest. *Photochem Photobiol* 1988; 48(3): 277-280.
14. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem* 2012; 19(28): 4850-4860.
15. Feng Y, Wang N, Ye X, Li H, Feng Y, Cheung F, et al. Hepatoprotective effect and its possible mechanism of *Coptidis rhizoma* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced chronic liver hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 2011; 138(3): 683-690.
16. Singal AK, Jampana SC, Weinman SA. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int* 2011; 31(10): 1432-1448.
17. Palma HE, Wolkmer P, Gallio M, Corrêa MM, Schmatz R, Thomé GR, et al. Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. *Mol Cell Biochem* 2014; 386(1-2): 199-210.
18. Lee CK, Kim NY, Han YN, Choi JW. Effects of pretreated Korean red ginseng on carbon tetrachloride and galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *J Ginseng Res* 2003; 27(1): 1-10.
19. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 1912; 12: 239-243.
20. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181(4617): 1199-1200.
21. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 1999; 299: 379-389.
22. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
23. Skotti E, Anastasaki E, Kanellou G, Polissiou M, Tarantilis PA. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Ind Crops Prod* 2014; 53: 46-54.
24. Liu SC, Lin JT, Hu CC, Shen BY, Chen TY, Chang YL, et al. Phenolic compositions and antioxidant attributes of leaves and stems from three inbred varieties of *Lycium chinense* Miller harvested at various times. *Food Chem* 2017; 215: 284-291.
25. Nirmal NP, Benjakul S. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *Lebenson Wiss Technol* 2011; 44(4): 924-932.

26. Rattaya S, Benjakul S, Prodpran T. Extraction, antioxidative, and antimicrobial activities of brown seaweed extracts, *Turbinaria ornata* and *Sargassum polycystum*, grown in Thailand. *Int Aquat Res* 2015; 7(1): 71-16.
27. Olatunde OO, Benjakul S, Vongkamjan K. Antioxidant and antibacterial properties of guava leaf extracts as affected by solvents used for prior dechlorophyllization. *J Food Biochem* 2018; 42(5): e12600.
28. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Shahidi F, Maqsood S. Antioxidant activity and inhibitory effects of lead(*Leucaena leucocephala*) seed extracts against lipid oxidation in model systems. *Food Sci Technol Int* 2013; 19(4): 365-376.
29. Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H. Antioxidant activity of some common plants. *Turk J Biol* 2008; 32: 51-55.
30. Swargiary A, Daimari A, Daimari M, Basumatary N, Narzary E. Phytochemicals, antioxidant, and anthelmintic activity of selected traditional wild edible plants of lower Assam. *Indian J Pharmacol* 2016; 48(4): 418-423.
31. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Sumpavapol P, Maqsood S. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *J Food Sci Technol* 2014; 51(11): 3026-3037.
32. Lanfer-Marquez UM, Barros RM, Sinnecker P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food* 2005; 38(8-9): 885-891.
33. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 2005; 90(1-2): 133-139.
34. Albishi T, John IA, Al-Khalifa AS, Shahidi F. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *J Funct Foods* 2013; 5(3): 1191-1203.
35. Yoo HJ, Ahn C, Narantuya L. Extractions of chlorophyll from spinach and mate powders and their dyeability on fabrics. *J Korean Soc Clothing Text* 2013; 37(3): 413-423.
36. Conforti F, Ioele G, Statti GA, Marrelli M, Ragno G, Menichini F. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(10): 3325-3332.
37. Qi B, Ji Q, Wen Y, Liu L, Guo X, Hou G, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis and senescence. *PLoS One* 2014; 9(10): e110275.
38. Ceccarini MR, Vannini S, Cataldi S, Moretti M, Villarini M, Fioretti B, et al. Codini M. In vitro protective effects of *Lycium barbarum* berries cultivated in Umbria(Italy) on human hepatocellular carcinoma cells. *BioMed Res Int* 2016; 2016: 7529521.
39. Bobek P. Dietary tomato and grape pomace in rats: effect on lipids in serum and liver, and on antioxidant status. *Br J Biomed Sci* 1999; 56(2): 109-113.
40. Erzurum SC, Lemarchand P, Rosenfeld MA, Yoo JH, Crystal RG. Protection of human endothelial cells from oxidant injury by adenovirus-mediated transfer of the human catalase cDNA. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(7): 1607-1612.
41. Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970; 34(1): 30-38.