

연자육 추출물의 항산화 및 산화적 DNA 손상억제 활성

박재호¹, 이병구², 변광인², 김도완^{1*}

¹중원대학교 한방산업학부, ²영남대학교 식품외식학부

Antioxidant Activities and Inhibitory Effect on Oxidative DNA Damage of Nelumbinis Semen Extracts

Jae-Ho Park¹, Byung-Gu Lee², Gwang-In Byun², Do-Wan Kim^{1*}

¹Faculty of Herb Industry, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

²School of Food Science and Technology, Gyeongsan, 712-749, Korea

ABSTRACT

Objective : This study was conducted to investigate the antioxidant activity and inhibitory effect on oxidative DNA damage of Nelumbinis Semen Extracts

Methods : Nelumbinis semen were extracted with hot-water and ethylacetate (EtOAC). The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging assay and Fe²⁺ chelating assay were performed for antioxidative effect and ϕ X-174 RF I DNA cleavage assay and intracellular DNA damage assay were used for inhibitory effect on intracellular DNA damage.

Results : In DPPH, Hydroxyl radical scavenging activity and Fe²⁺ chelating activity of EtOAC extracts were 96.22%, 53.53%, 64.72%, while those of hot-water extracts were 20.86%, 10.72%, 29.74% at 200 μ g/ml, respectively. In ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay, the protective effects of EtOAC and hot-water extracts against oxidative DNA damage were 76% and 6% at 200 μ g/ml, respectively.

Conclusion : These results indicated that the seed extracts of *Nelumbo nucifera* can be used as a natural antioxidants, which effectively inhibits the oxidative DNA damage.

Key words : Nelumbinis Semen, DPPH, Hydroxyl radical, Fe²⁺ chelating, DNA cleavage, DNA migration

서 론

최근 증가하고 있는 환경오염 물질, 환경 호르몬, 흡연 및 알코올 등은 인체 내 산화적 스트레스를 가중시키고 있다. 그러나 정상적인 경우에는 체내 항산화 시스템에 의해 제거되지만 체내 산화-항산화 시스템의 균형이 깨어지면 세포대사과정 중 발생된 hydrogen peroxide(H₂O₂), superoxide(O²⁻) 그리고 hydroxyl radical(OH⁻) 등과 같은 불안정하고 반응성이 매우 강한 활성산소에 의해 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 비가역적으로 파괴되고 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기 질환, 염증, 류마티스, 면역 질환 등의 각종 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 특히 최근 활성산소가 다양한 질환 중 암과 높은 상관관계가 있다는 연구보고와 함께 유해 산소를 억제시킬 수

있는 항산화 물질들이 개발되어 이용되고 있으나, 합성 항산화제의 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등의 부작용이 제기 되고 있다. 예를 들어 기존에 많이 사용하고 있는 항산화제로는 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제와 토코페롤과 같은 천연 항산화제가 있다. BHT와 BHA는 우수한 항산화력을 지니고 있지만 과량 섭취 시 암유발 가능성 등 안정성이 논란이 되고 있으며, 토코페롤은 가격이 높아 이들을 대체할 수 있는 안전하고 경제적인 항산화제의 개발이 요구되고 있다³⁾. 이에 식품과학 분야에서는 천연 약용식물로부터 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 활발히 행해지고 있으며 나아가 이들 생리활성 소재를 추출하여 첨가한 기능성 식품의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다⁴⁾. 또한 약용식물은 천연식물의 약리적

*교신저자 : 김도완. 충청북도 괴산군 괴산읍 동부리5 중원대학교 한방산업학부.

· Tel : 043-830-8612, · E-mail : dwkim1126@jwu.ac.kr.

· 접수 : 2010년 11월 4일 · 수정 : 2010년 12월 4일 · 채택 : 2010년 12월 15일

효능과 더불어 항산화 작용을 할 수 있는 생리 활성 물질을 함유하고 있어 유용한 연구재료가 되고 있다⁵⁻⁷⁾.

연자육(Nelumbinis semen)은 수련과에 속하는 연꽃(*Nelumbo nucifera*)의 성숙한 종자로 가을에 수확하여 과피를 제거하고 말린 것으로 한방에서는 위장을 강화시켜 설사를 억제하고, 신장을 강화하여 강정작용이 있으며, 신경을 안정시키는 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 한의학 측면에서 연자육은 맛이 달고 성질이 순하며, 歸經은 脾, 腎, 心 이고, 비장강화, 설사완화, 신장보호, 사정억제 등의 효능 보고되고 있다⁹⁾. 최근 연구결과에 의하면 연자육은 고혈압과 부정맥과 같은 심장혈관 질환 치료 작용¹⁰⁾과 항암제, 이노제, 피부질환 치료 효능이 있다고 보고되었다¹¹⁾.

본 연구에서는 연자육 추출물의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제활성을 평가하고, 추출물 내 항산화 물질을 분석함으로써, 연자육의 항산화 및 암 예방적 소재로서의 이용 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 본 연구에 사용된 연자육(Nelumbinis semen)은

대구약업주식회사(원산지 베트남, 제조번호 DA-67-3, 검사기관 광명생약실험실)에서 수입한 것을 경북 안동 한약제도매상에서 구입하여 사용하였다.

2)세포주

한국 세포주 은행에서 마우스 피부 섬유아세포(NIH 3T3, KCLB No. 21658)를 분양받아 배양하면서 본 연구에 사용하였다.

2. 방법

1) EtOAC 추출

건조된 연자육 300 g을 분쇄한 후 80% methanol 1,000 ml을 가하여 3일간 침지한 후 여과하였다. 여과된 추출물은 200 ml로 농축한 다음 50 ml 증류수를 첨가하고 이를 petroleum ether로 분획하였다. 분획된 수용층을 다시 ethyl acetate(EtOAC)로 분획한 다음, EtOAC 층을 sodium sulfate anhydrous로 탈수시킨 뒤 감압 농축하여 건조 하였다.

2) H₂O 추출

건조된 연자육 300 g을 분쇄한 H₂O 1,000 ml을 가하여 100℃에서 2시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과한 뒤 동결 건조기를 이용하여 건조 하였다.

3) DPPH 라디칼 소거 활성

각 추출물의 DPPH에 대한 전자 공여능은 Bondet¹²⁾ 방법에 의해 측정하였다. 여러 농도의 추출물 40 μl를 300 μM DPPH/EtOH 760 μl에 첨가한 후 30분간 37℃에서 방치한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 연자육 추출물의 전

자 공여능은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

4) Hydroxyl 라디칼 소거 활성

각 추출물의 hydroxyl 라디칼 소거 능은 Smirnoff와 Cumbes¹³⁾ 방법에 따라 FeSO₄와 H₂O₂의 Fenton 반응에 의해 생성된 Hydroxyl 라디칼에 의해 가수분해 되는 정도를 통해 측정되었다. 1.5 mM FeSO₄와 6 mM H₂O₂ (3.5 : 5)의 37℃에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μl와 농도별 시료 40 μl를 혼합한 후 37℃에서 약 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 200 mM sodium salicylate 200 μl를 첨가 한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 소거능(%)을 구하였다.

$$\text{소거 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

5) Fe²⁺ 킬레이팅 활성

연자육 추출물의 철-킬레이팅 활성은 Hus¹⁴⁾ 방법에 의해 측정되었다. 2 mM FeCl₂ 60 μl, 농도별 시료 40 μl와 증류수 700 μl를 혼합한 후 상온에서 약 10분간 반응 시켰다. 반응 후 5 mM ferrozine을 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하기 위해 상온에서 약 5분간 반응 시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식으로 킬레이팅 활성(%)을 구하였다.

$$\text{킬레이팅 활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

6) ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay

연자육 추출물의 산화적 ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage 억제활성은 Jung(2001) 등의 방법으로 측정되었다. plasmid DNA의 super-coiled 형태가 open-circular와 linear 형태로 변환되는 정도는 산화적 DNA 손상 지표로 사용되어왔다¹⁵⁾. 1.5 mM FeSO₄와 6 mM H₂O₂(3.5 : 5)의 37℃에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μl와 농도별 시료 40 μl를 혼합한 후 37℃에서 약 30분 동안 반응시켰다. 30분 후 반응 혼합물 20 μl와 ϕ X-174 RF I plasmid DNA 5 μl를 다시 혼합하여 37℃에서 약 30분간 재반응 시켰다. 5 μl 버퍼(50% glycerol(v/v), 40 mM EDTA and 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 사진 촬영하였다.

7) Intracellular DNA migration assay

NIH3T3 세포는 10%의 fetal calf serum(FBS)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포는 5일에 1번 계대배양 하였으며, 본 실험을 위해 배양중인 세포를 phosphate buffer saline(PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco CO, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 Coulter counter(Backman, USA)로 세포를 계수한 뒤 6 well plate에 일정수(2 × 10⁶/ml)를

분할하여 24시간 동안 배양하였다. 연자육 추출물을 농도별로 첨가하고 30분 동안 배양시킨 후 최종농도가 1 mM이 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 약 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 intracellular DNA 추출을 위해 세포를 회수하고 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS and 0.5 mg/ml proteinase K) 20 μ l로 약 55°C에서 60분간 용해 시켰다. 세포 용해 후 원심분리를 통해 세포 잔해물을 제거하고 RNase 5 μ l 첨가 후 약 55°C에서 60분간 재 반응 시켰다. 주입버퍼(50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA and 0.05% bromophenol blue) 10 μ l를 첨가한 후 70°C에서 10분간 방치 후 2% agarose 겔로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 사진 촬영을 하였다.

8) 총 페놀 화합물 함량

연자육 추출물의 총 페놀 화합물 함량은 Folin-denis 방법으로 비색 정량하였다¹⁶⁾. 각 추출물을 메탄올에 10 mg/ml 농도로 녹인 시료 1 ml와 Folin 시약 1 ml를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 10% Na₂CO₃ 용액 1 ml를 혼합한 후 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 화합물의 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

9) GC/MS 분석

연자육 EtOAC 분획물의 항산화 물질을 동정하기 위하여 GC/MS(HP6890GC/5973MSD, USA)을 이용하여 분석하였다. Column은 Ultra 2(Crosslinked 5% PH ME siloxane, HP-19091B), Oven 조건은 100°C에서 분당 4°C씩 295°C까지 승온 하였다. 운반체는 He 가스를 사용하였으며, 유속은 0.8 ml/min으로 분석하였다. 각 분리된 peak는 mass spectrum으로부터 Library(Wiley7N)를 이용하여 동정되었다. 메탄올로 조제된 시료(4 mg/ml)를 2 μ l 주입하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 활성

EtOAC 분획과 열수 추출에 의해 분리된 연자육 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH, Hydroxyl 라디칼 소거 활성과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 측정하였다(Figure 1). DPPH 자유라디칼 소거법은 추출물 내 항산화 물질에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리에 의해 측정 되었다. 연자육 EtOAC 분획물은 200 μ g/ml에서 DPPH 소거활성이 96.54% 인데 비해 열수 추출물에서는 21.25%의 소거활성을 나타내었다. 또한 Hydroxyl 라디칼 소거활성과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 추출물 200 μ g/ml에서 EtOAC 분획물이 55.27%, 66.17%의 활성이 각각 나타났으며, 열수 추출물에서는 각각 15.72%, 30.52%로 열수 추출물에 비해 EtOAC 분획물의 항산화 활성이 매우 높은 것으로 나타났다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS) 중 hydrogen

peroxide와 superoxide는 반응성이 약하여 직접적으로 조직 손상에 참여하는 경우는 드물지만, hydroxyl radical과 같은 반응성이 매우 큰 라디칼 종은 생체분자들에 심각한 손상을 초래한다. 또한 세포 호흡 등 생리과정에서 필수적인 금속인 철(Fe, iron)의 과잉현상은 생체 내에 존재하는 hydrogen peroxide와의 fenton reaction에 의해 단백질 및 DNA 산화, 세포노화와 세포손상을 야기하는 강력한 hydroxyl radical을 생성한다. 따라서 hydroxyl radical의 소거 능력과 Fe²⁺ 이온의 킬레이팅 능력은 항산화제의 중요한 조건이라 여겨지고 있다^{17,18)}.

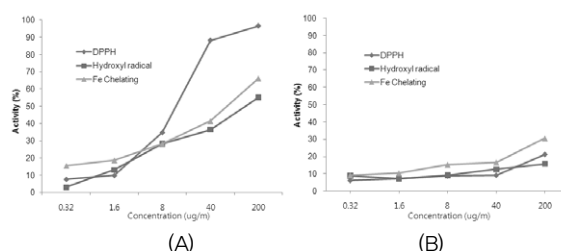


Figure 1. Antioxidant activities of seed extracts from *Nelumbo nucifera*. (A) EtOAC extracts, (B) Hot water Extracts.

2. 산화적 DNA 손상 억제

DNA 손상을 일으키는 4가지의 중요한 과정으로는 oxidation, methylation, deamination, depurination 등이 있으며 이중에서 oxidation이 가장 크게 손상을 일으키는 것으로 알려져있다¹⁹⁾. 세포는 활성산소에 대항하기 위한 다양한 항산화 체계를 갖고 있으나, 활성산소가 세포의 보호 체계를 압도하여 산화환원 항상성을 변화시키게 될 때, 결과적으로 Oxidative stress에 노출되어 있다. 산화적 변이는 주로 단백질, 지질, DNA에서 발생되는데 단백질과 지질을 쉽게 분해되고 재합성되기 때문에 Oxidative stress에 의한 가장 큰 영향은 DNA 손상에 의한 암의 유발이라 할 수 있다²⁰⁾. 암은 유전적인 요인과 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 진행되는 다단계 과정이다. 정상세포에서 암 조직으로 발달되는 과정에는 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있으며, 발암의 initiation은 전자 친화성 발암인자(initiator)가 생체 내에서 대사적으로 활성화되어 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합함으로써 정상세포의 DNA를 손상시켜 신생물 전구세포(preneoplastic cell)를 형성하는 돌연변이 현상으로 설명된다. 암의 initiation 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암 발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 initiation 단계에서의 DNA 손상 억제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다^{21,22)}. 연자육 추출물의 산화적 DNA 손상 억제 활성은 ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포적 시스템과 intracellular DNA migration assay(Figure 3)를 통한 세포적 시스템으로 평가 되었다. ψ X-174 RF I plasmid DNA를 이용한 연자육 추출물의 DNA 손상 억제력을 확인한 결과(Figure 2), EtOAC 분획물의 저농도에서 산화적 DNA 손상 억제력은 매우 낮았으나, 200 μ g/ml 농도에서 76%로 높은 DNA 손상 억제 활성을 나타냈다(Figure 2A). 그러나 hydroxyl radical 소거 활성이 낮은 열수 추출물에서는 200 μ g/ml 농도에서 6%의 낮은 산화적

DNA 손상 억제력을 보였다(Figure 2B). 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled(SC) 형태로 존재하나 추출물 처리 없이 H₂O₂와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical 또는 iron 존재 하에서는 산화적 손상을 받아 open-circular(OC)형태로 전환된다. Intracellular DNA migration assay를 통한 연자육 추출물의 DNA 손상 억제 활성을 평가한 결과(Figure 3), hydroxyl radical 소거 활성이 높은 EtOAC 분획물은 200 µg/ml와 40 µg/ml 농도에서 대조구와 비교하여 높은 DNA 손상 억제 활성을 나타내었고(Figure 3A), 열수 추출물에서는 200 µg/ml 농도에서만 DNA 손상 억제 활성을 나타내 열수 추출물의 DNA 손상 억제 활성이 낮은 것으로 나타났다(Figure 3B).

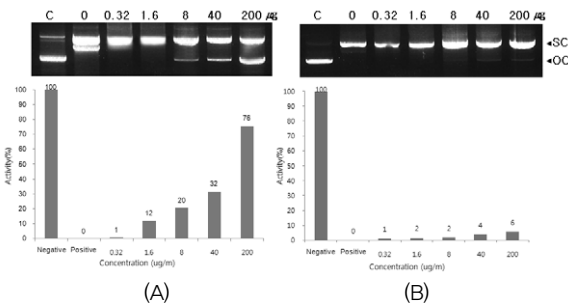


Figure 2. Protective effect of seed extracts from *Nelumbo nucifera* against oxidative DNA damage by blocking the generation of hydroxyl radical via its Fe²⁺ chelating activity. (A) EtOAC extracts, (B) Hot water extracts.

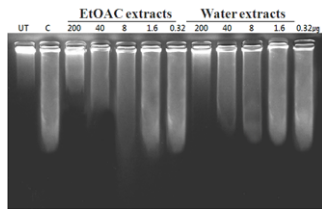


Figure 3. Protective effect of the seed extracts from *Nelumbo nucifera* against oxidative DNA damage by intracellular DNA migration assay. (UT) : Untreated control, (C) : Control

3. 총페놀 화합물 함량 및 GC/MS 분석

연자육의 EtOAC 분획물과 열수 추출물의 총페놀 화합물의 함량을 조사한 결과(Figure 4), EtOAC 분획물의 총페놀 화합물의 함량은 31.8%였으며, 열수 추출물은 3.1%로 나타났다. 페놀성 화합물은 과일이나 채소가 분해될 때 그리고 녹차, 홍차 및 와인 등에서 주로 발견되는 화합물로서 항균, 항알러지 효과와 천연 항산화 물질로서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구결과에 의하면 열수 추출물에 비해 EtOAC 분획물의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 활성이 매우 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 각 추출물 내 페놀성 화합물 함량의 차이에 의한 것으로 사료되어진다. 또한 페놀성 화합물의 함량이 높은 EtOAC 분획물을 GC/MS에 의해 분석한 결과(Figure 5, Table 1), Benzeneethanol, 3-methyl-Benzoic acid, 4-ethyl-Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) Phenol 등 페놀성 화합물이 다수 동정되었다.

본 연구결과에 의하면 연자육 EtOAC 분획물이 열수 추출물에 비해 항산화 활성, DNA 손상 억제 효과 그리고 총 페

놀의 함량이 월등히 높은 것으로 나타났다. 따라서 연자육 추출물의 항산화력은 산화적 DNA 손상억제에 매우 효율적이고, 이러한 결과는 추출물내 페놀성 화합물에 의한 것으로 사료된다.

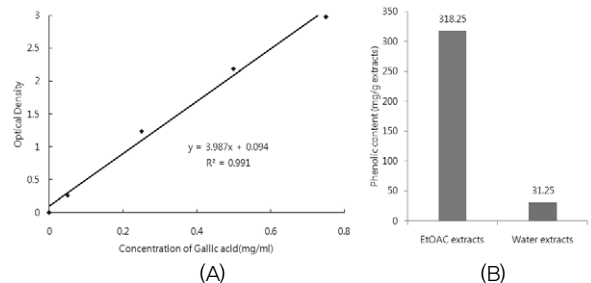


Figure 4. Concentration of total phenolic compounds of seed extracts from *Nelumbo nucifera*. (A) Calibration curve, (B) Contents of total phenolic compounds

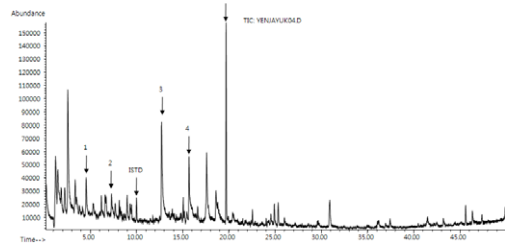


Figure 5. GC/MS chromatogram of seed extracts from *Nelumbo nucifera*.

Table 1. Main compounds of the flower extracts from *Nelumbo nucifera* analyzed by GC/MS

Peak No.	Compounds	Peak area / ISTD peak area
1	Benzeneethanol	2,40
2	3-methyl Benzoic acid	1,92
3	4-ethyl Phenol	8,72
4	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)Phenol	5,22
5	Lauric acid	7,08

요 약

본 연구에서는 연자육의 항산화 활성을 평가하기 위해 EtOAC 분획물과 열수 추출물을 이용하여 DPPH, Hydroxyl 라디칼 소거활성과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 측정하였다. 또한 산화적 DNA 손상억제 효과는 ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 통해 평가하였다. EtOAC 분획물은 200 µg/ml에서 DPPH, Hydroxyl 라디칼 소거활성과 Fe²⁺ 킬레이팅 활성이 각각 96.54%, 55.27%, 66.17%의 활성이 나타났으며, 열수 추출물에서는 각각 21.25%, 15.72%, 30.52%로 열수 추출물에 비해 EtOAC 분획물의 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 또한 ϕ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay에서 EtOAC 추출물은 200 µg/ml에서 76%의 높은 억제 효과가 나타난 반면, 열수 추출물은 6%의 낮은 DNA 산화적 손상억제 효과를 나타내었다. 각 추출물의 총 페놀 함량을 조사한 결과 열수 추출물에 비해 EtOAC 분획물이 높은 것으로 나타났다. 항산화 활성과 DNA 산화적 손상억제 효과가 높은 EtOAC 분획물을 GC/MS에 의해 분석

한 결과, Benzeneethanol, 3-methyl-Benzoic acid, 4-ethyl-Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)Phenol 등 페놀성 화합물이 다수 동정되었다. 본 연구결과에 의해 연자육은 항산화 및 암 예방적 소재로서의 새로운 기능성 식품소재로서 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

참고문헌

- Harold ES, Darrell EA, Evan IF, John AM. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007;18:567-79.
- Jung DS. Player's training of physical strength and reactive oxygen. *J. Sports Sci*. 2003;86:32-9.
- Branen AL. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 1975;52:59-63.
- Oh HS, Kim JH. Development of functional soy-based stwe sauce including hot water extract of *Coruns officinalis* S, et Z. *Korean J. Food Culture*. 2006;21:550-58.
- Lee JS, Park YK, Ahn YS, Kim HS, Chung MN, Jeong BC and Bang JK. Antioxidative and biological activities of extracts of sweetpotato tips. *Korean J. Crop Sci*. 2007;52(2):228-38.
- Lee, K.S., Kim, M.G., Lee, K.Y. Antioxidative activity of ethanol extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 200;35(2):182-6.
- Yoo JS, Song YK, and Lim HH. Studies on the antioxidant effects of Carthami Flos extract. *J. Korean Oriental Med*. 2007;28(1):137-47.
- 서부일, 이제현, 최호영, 권동렬, 부영민. *한약본초학*. 서울 : 영림사 2006:936-8.
- Yi D, Yong P and Li W. Chinese functional food. New Word Press:Chinese, 2005:142.
- Ling ZQ, Xiw BJ and Yang EL. Isolation, characterization and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seeds of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J. Agri. Food Chem.*, 2005;53:2441-5.
- Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao, JF, Hen CF, and Kuo YC. The extract from *Nelumbo nucifera* supress cell cycle progression, cytokine genes expression and cell proliferation in human perpheral blood mononuclear cell. *Life Science*. 2004;75: 699-716.
- Bondet V, Brand Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss. U-Technol*. 1997;30:609-15.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 1989;28:1057-60.
- Hus B, Coupar IM, Ng K. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*. 2006;98:317-28.
- Jung Y, Surh Y. Oxidative DNA damage and cytotoxicity unduced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic. Biol. Med*. 2001;30:1407-17.
- AOAC : Official methods of Analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, Cd 1990:8-35.
- Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*. 2005;89:569-75.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med*. 1995;18:321-36.
- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens, Oxygen radical and degenerative diseases, *Science*. 1983;221:1246-56.
- Kawanishi S, Hiraku Y, and Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Res*. 2001;488: 65-76.
- Surh YJ. Molecular mechanical of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res*. 1999;428:305-27.
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein, R.A., Finkel, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93:11848-52.