

서리태 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 암세포 증식 억제 효과

전연희·원지혜·권지은·김미라^{1†}

경북대학교 식품영양학과, ^{1†} 경북대학교 식품영양학과·장수생활과학연구소

Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of an Ethanol Extract from *Seoritae*

Yeon Hee Jeon, Ji Hye Won, Ji Eun Kwon and Meera Kim^{1†}

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

^{1†} Department of Food Science and Nutrition·Center for Beautiful Aging Kyungpook National University

Abstract

The antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from *Seoritae* were analyzed to develop new functional food materials. The antioxidant activity of *Seoritae* was determined by measuring electron donating ability with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) assays, as well as the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The cytotoxic effect of the *Seoritae* ethanol extract was measured with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. As a result, the electron donating abilities of *Seoritae* against the DPPH and ABTS radicals were 63.75% and 87.68% at 500 µg/assay, respectively. The IC₅₀ values of *Seoritae* in the DPPH and ABTS assays were 385.39 µg/assay (128.46 µg/mL) and 209.39 µg/assay (51.83 µg/mL). Additionally, the FRAP value of *Seoritae* was 0.84 FeSO₄ eq. mM at 800 µg/assay. The total amounts of polyphenols and flavonoids, which indicate the antioxidant capability of *Seoritae* extract were 1.65 mg/g and 0.59 mg/g, respectively. Moreover, *Seoritae* extract showed a high cytotoxic effect of up to 81% against human cancer cells, particularly A-549 and HeLa cells. The growth inhibition rate of *Seoritae* extract against A-549 and HeLa cells was up to 76.48% and 75.67% in the MTT assay, and 78.98% and 80.54% in the SRB assay, respectively. The results of this study suggest that an ethanol extract of *Seoritae* is a potentially good natural antioxidant.

Key words : antioxidant, cytotoxicity, phytochemical, *Seoritae*

1. 서론

활성 산소종(reactive oxygen species)은 대부분의 전자운반 과정 혹은 에너지대사 과정 중 불완전하게 환원되거나

cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성된다. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는 항산화 시스템에 의해 활성 산소종이 제거되지만 이 시스템의 작동이 원활하지 못하면 세포는 산화적 손상을 입게 된다. 따라서 이러한 활성 산소종에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호할 수 있는 항산화제에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다(오상진 2005).

식품에는 butylated hydroxy anisole(BHA)과 butylated hydroxy toluene(BHT) 등 우수한 항산화 능력을 가진 합성 항산화제가 널리 사용되고 있지만 이들을 다량 섭취할 경우 효소와 지질의 병리학적 변성과 유도종이나 편평세포암종과 같은 암 등의 부작용이 나타날 수 있는 것으로 보고되어 천

[†] Corresponding author : Meera Kim, Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, South Korea.

Tel: +82-53-950-6233

Fax: +82-53-950-6229

E-mail: meerak@knu.ac.kr

연 항산화제의 개발과 이용에 대한 요구가 증가하고 있다 (Brannen AL 1975, Ito N 등 1983, Williams GM 등 1999). 이에 따라 다양한 천연 자원으로부터 안전하고 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 국내외적으로 활발히 진행되고 있다(Moon GS 1997, Bandoniene D 등 2000, Lee SE 등 2002, Arai S 등 2002, Jung SJ 등 2004, Myung JE와 Hwang IK 2008, Bae EA와 Kim HS 등 2009).

콩의 원산지는 한반도와 동북아시아 일대라고 알려져 있고, 우리나라에서 콩을 재배한 지는 4,000여년이 넘었으며 (Sohn Jh 등 2001), 현재에도 콩은 주식과 부식으로 널리 이용되고 있다. 검정콩은 콩과(Leguminosae)에 속하며 특정한 종류의 콩을 가리키는 것이 아니라 검은빛을 띠는 콩을 총칭하는 말이며 '흑태(黑太)', '서리태', '서목태(鼠目太)' 가 이에 속한다. 예로부터 대두권(大豆券) 또는 대두벽(大豆藥)이라고도 불리는 대두황권(大豆黃卷)으로 만들어 약으로도 사용해왔고, 중국 명나라 때의 약학 서적인 '본초강목'에 검은콩은 신장을 다스리며 혈액순환을 돕고 해독작용을 한다고 기록되어 있으며, 노인성 치매예방에도 효과가 있다고 보고되었다(Shin HC 등 2001). 콩은 항산화 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있는데 검정콩이 황색콩이나 녹색콩보다 항산화력이 더 높은 것으로 보고되었다(Myung JE와 Hwang OK 2008). 또한 검정콩은 황색콩보다 무름성이 좋아 쌀에 넣어 밥을 지을 때 많이 사용되고 있다(Kim YH 1999). 검정콩 중 하나인 '서리태'는 껍질이 검고 속은 노란빛을 띠는 콩으로 검은콩 중에 크기가 가장 크다. '서리태'는 생육기간이 길어 10월 초순경에 수확을 하는데 서리를 맞아가며 자란다 하여 서리태란 이름이 붙여졌다. 또 껍질은 검은색이지만 속이 파랗다고 하여 속칭이라고도 불린다. 약용보다는 주로 밥에 넣어 먹는 콩으로 사용되어 왔으며 이 밖에도 요즘에는 아이스크림, 과자, 음료 등의 재료로도 이용되고 있다. 쥐눈이 콩이라고도 불리는 '서목태'는 한약재로도 사용되어 약콩이라고 불린다. 약콩은 혈액순환, 간 기능 보호의 약리작용과 더불어 노인성 치매 예방과 신장 기능을 향상시키는 것으로 보고되고 있다(Kim MH 등 2008). 서리태는 수분 8.9%, 당 25.3%, 조단백질 42.3%, 조지방 19.0%, 회분 4.5%로 구성되어 있으며(Kim KS 등 2003), 서리태의 항산화 활성 및 항산화 물질에 관한 연구들이 수행되었다(Bae EA와 Moon GS 1997, Kim SH 등 2005, Myung JE와 Hwang IK 2008). 이밖

에도 검은콩 종피에서 추출한 안토시아닌의 항산화 효과 (Kim YH 등 2006, Sohn Jh 등 2001) 및 암세포 독성(Kim YH 등 2008) 등에 대해 보고된 바 있으며, 가공식품의 제조에 있어서 검정콩으로 제조한 청국장과 메주의 항산화 및 아질산염 소거 효과에 대해 보고된 바 있으나(지희연 등 2007) 서리태의 항암 활성 등 생리활성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 서리태의 항산화 활성을 측정하고 항산화 작용물질로 알려진 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석하며 암세포에 대한 증식 억제능력을 측정함으로써 서리태의 생리활성을 탐색하고 기능성식품 소재로서의 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

1) 실험재료

본 실험에서 사용한 서리태는 포항시 숙장면에서 수확된 것으로 국내에서 시판되는 제품을 사용하였다.

2) 시약

본 실험에서 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MIT), gallic acid, quercetin, sulforho damine B(SRB), tert-butylated hydroxyanisole(BHA), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-stri-azine(TPTZ), iron (III) chloride($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 2-2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)는 Fluk(Heidelberg, Germany)로부터 구입하였으며, Folin-Ciocalteu's phenol reagent는 Fluka(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였다. 암세포 억제 활성 측정을 위한 Minimum essential medium(MEM, with L-glutamin & Earle's balanced salts)은 Hyclone Co.(USA)로부터, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL(NY, USA)로부터, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 Duksan(Seoul, Korea)으로부터 각각 구입하여 사용하였다.

3) 세포주

암세포 억제 활성을 검색하기 위하여 A-549(인체 폐암세포), G-361(인체 피부암세포), HeLa(인체 자궁암세포), MCF-7(인체 유방암세포)를 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양액으로는 10% FBS와 1% penicillin-K-streptomycin이 첨가된 RPMI 1640을 사용하였다. 배양액에 분주된 세포주는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 서리태 에탄올 추출물 제조

서리태 추출용매와 추출조건은 선행연구들을 참고하여 정하였다(Kim SH 등 1994, Han SH 등 2006, Park YO와 Lim HS 2009). 서리태 100 g을 분쇄한 후 70% 에탄올 500 mL를 가하여 항온수조(37℃)에서 12시간 추출하는 과정을 총 4회 실시한 후 여과지(Toyo No. 2, Advantec, Japan)로 여과하였다. 이 여과액을 회전감압농축기(EYELA, Rikakiki, Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후, 동결건조하여 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

2) 항산화 활성 측정

(1) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 측정

서리태 에탄올 추출물의 전자공여능은 Blois MS(1958)의 방법으로 측정하였다. 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 용해한 시료 용액 1 mL와 7.5×10^{-5} M DPPH 용액 2 mL를 혼합하여 항온수조(37℃)에서 30분간 반응시킨 후 UV/Visible Spectrophotometer(Beckman, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 BHT를 사용하였고, 시료의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능은 아래의 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

시료의 농도에 대한 전자공여능(%)의 식을 이용하여 자유 라디칼의 활성을 50%로 저해하는데 필요한 농도인 IC₅₀ 값 또한 산출하였다.

(2) ABTS 라디칼에 대한 전자공여능 측정

서리태 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 Re R 등 (1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 증류수에 용해시킨 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM 과황산칼륨 용액을 1:1로 혼합하여 12~16시간 동안 30℃ 암소에서 방치한 후 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 734 nm에서 흡광도가 0.7~0.8이 되도록 희석하였다. ABTS 희석용액 4 mL와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 용해시킨 시료 40 µL를 혼합한 다음 정확히 1분간 반응시킨 후 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 BHA를 사용하였고, DPPH 라디칼에 대한 전자공여능과 동일한 식을 이용하여 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능과 IC₅₀ 값을 산출하였다.

(3) FRAP법에 의한 항산화 효과 측정

FRAP assay는 Benzie F와 Strain J(1999)의 방법을 사용하였다. FRAP reagent는 37℃에서 300 mM의 acetate buffer(pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해한 10 mM의 TPTZ, 20 mM FeCl₃·6H₂O를 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 제조하였다. 각 농도별 시료 0.1 mL에 제조한 시약 3 mL를 가하여 UV/Vis Spectrophotometer를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하고 37℃에서 4분간 반응시킨 다음 흡광도를 다시 측정하였다. 항산화력은 FeSO₄·7H₂O를 이용하여 얻은 검정선의 식을 사용하여 FeSO₄ eq. mM로 나타내었다.

3) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu(FC)법(Pellegrini N 등 1999)에 의해 측정되었다. 증류수 5 mL와 시료 1 mL, FC reagent 0.5 mL를 차례대로 혼합한 후 8분간 방치하고, 10 mL의 7% Na₂CO₃를 첨가하였다. 증류수로 최종부피를 25 mL로 맞춘 후 상온에서 2시간 동안 반응시키고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 작성된 검량곡선을 통하여 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

서리태 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량은 Nieva

4 전연희 · 원지혜 · 권지은 · 김미라

Moreno MI 등(2000)의 방법으로 측정되었다. 1 M aqueous potassium acetate 0.1 mL, 시료 0.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 혼합한 후 40분간 방치한 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 이용하여 작성된 검량곡선을 통하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

4) 암세포 증식 억제 활성 측정

서리태 추출물의 암세포 증식 억제 활성을 검색하기 위하여 A-549, G-361, HeLa, MCF-7을 이용하여 MTT와 SRB 분석을 수행하였다.

(1) MTT assay

서리태 에탄올 추출물의 MTT assay는 Carmichael J 등(1987)의 방법을 이용하여 측정하였다. 우선 1×10^4 cells/mL의 농도로 희석한 암세포 180 μ L를 96 well plate의 각 well에 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 24시간 선배양하였다. 선배양 후, 각 well의 배지 80 μ L를 제거한 다음 시료 100 μ L를 첨가하여 같은 조건의 CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 well에 MTT 용액 20 μ L를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하였다. 각 well에 DMSO:EtOH(1:1, v/v) 용액 150 μ L를 첨가한 다음 진탕배양기에서 30분간 교반한 후 ELISA reader(Versamax, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) SRB assay

서리태 에탄올 추출물의 SRB assay는 Doll R과 Peto R(1981)의 방법을 이용하여 측정하였다. 암세포를 96 well plate의 각 well에 5×10^4 cell/mL 농도로 100 μ L씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후, 각 well당 시료를 100 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 재배양하였다. 그 후, 상등액을 제거하고 10% TCA를 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 냉장 방치한 다음, TCA를 제거하고 증류수로 5번 세척한 후 실온에서 건조하였다. 각 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB 용액을 100 μ L씩 첨가하여 30분 동안 염색한 후, 1%(v/v) acetic acid로 5회 세척한 다음 건조하였고, 10 mM tris buffer(pH

10.5) 100 μ L로 염색된 SRB를 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계분석

본 연구의 실험결과는 SPSS(v. 14.0) 프로그램을 이용하여 유의성을 검정하였다. 시료의 농도에 따른 항산화 활성 및 암세포 증식 억제 활성의 농도간, 세포주간의 유의성은 Duncan's multiple range test(p(0.05)를 이용한 one-way ANOVA를 실시하였고, 시료의 항산화활성과 대조구로 사용된 합성 항산화제 간의 유의성은 Student's t-test를 실시하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출물의 항산화 활성

1) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능

서리태 에탄올 추출물의 추출수율은 $4.95 \pm 0.09\%$ 로 나타났다. 서리태의 항산화 활성 측정 방법 중 하나인 DPPH법은 항산화 활성을 가지는 물질이 DPPH 유리 라디칼에게 전자를 공여해줌으로써 유리라디칼이 소거되고 이때 탈색이 일어나는 원리를 이용하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 방법으로 항산화 활성 측정에 널리 사용되고 있는 방법이다(Yen GC와 Chen HY 1995). 서리태 에탄올 추출물의 농도별 전자공여능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 서리태 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 전자공여능도 함께 증가하였다. 300 μ g/assay 이하의 농도에서는 서리태 에탄올 추출물의 전자공여능이 50% 미만으로 나타났으나, 400 μ g/assay의 농도에서는 51.2%의 전자공여능을, 500 μ g/assay의 농도에서는 60%가 넘는 전자공여능을 나타내었다. 본 실험의 서리태 에탄올 추출물은 500 μ g/assay(166.67 ppm)에서 63.75%의 전자공여능을 나타낸 반면, Myung JE와 Hwang IK(2008)의 연구에서는 400 ppm의 청자콩 에탄올 추출물의 전자공여능이 22.1%로 보고되어 콩의 종류에 따라 전자공여능에 차이가 있음을 볼 수 있었으며, 서리태의 전자공여능이 비교적 높음을 확인할 수 있었다. 또한 서리태 에탄올 추출물의 IC₅₀값은 385.39 μ g/assay(128.46 μ g/mL)로 오미자

에탄올 추출물의 IC₅₀값인 435.4 µg/assay(145.1 µg/mL)보다 낮았으며(Jeon YH 등, 2008a), Lee SE 등(2002)에 의해 연구된 백부자(696.77 µg/mL)와 결명자(306.18 µg/mL), 오매(342.45 µg/mL)의 IC₅₀값보다도 낮아 서리태 에탄올 추출물이 DPPH 라디칼에 대한 높은 전자공여능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Electronic donating ability of the ethanol extract from *Seoritae* by DPPH radical-scavenging method

Concentration (µg/assay)	DPPH radical-scavenging ability (%)	
	BHT	Ethanol extract of <i>Seoritae</i>
100	44.05±0.83 ^{1)a2)}	16.30±1.90 ^{3)a}
200	64.29±1.29 ^b	30.12±4.98 ^{ab}
300	73.40±2.48 ^c	43.22±7.53 ^{bc}
400	81.78±1.57 ^d	51.16±6.99 ^{cd}
500	86.91±0.24 ^e	63.75±8.34 ^e

¹⁾ Data were the mean±SD of triplicate experiment.
²⁾ The different small letters (a-e) mean significant difference among the different concentrations (column) (p<0.05).
³⁾ * means significant difference between BHT and ethanol extract of *Seoritae* at the same concentration (row) by Student's t-test (p<0.05).

2) ABTS 라디칼에 대한 전자공여능

ABTS 라디칼 소거활성은 산화유도제인 potassium persulfate와의 반응에 의해 형성된 ABTS 양이온이 시료 중의 항산화 물질에 의해 제거될 때 일어나는 탈색 반응을 이용하여 물질의 항산화 능력을 측정하는 방법이다(Myung JE와 Hwang IK, 2008). 본 실험에서 서리태 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 Table 2에 나타내었다.

서리태 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 서리태 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 앞서 언급한 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능 결과와 마찬가지로 시료농도가 200 µg/assay 이하까지는 ABTS 라디칼 소거 활성이 50% 미만이었으나 300 µg/assay 이상의 농도에서는 50% 이상의 활성을 나타내었다. 특히 서리태 에탄올 추출물의 농도가 100 µg/assay에서 200 µg/assay으로 증가함에 따라 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성이 2배 이상 증가하여 항

Table 2. Electronic donating ability of the ethanol extract from *Seoritae* by ABTS radical-scavenging method

Concentration (µg/assay)	ABTS radical-scavenging ability (%)	
	BHA	Ethanol extract of <i>Seoritae</i>
100	99.66±0.00 ^{1)NS2)}	23.40±0.56 ^{3)a4)}
200	99.66±0.02 ^{NS}	48.36±2.41 ^b
300	99.66±0.00 ^{NS}	65.52±6.86 ^c
400	99.66±0.00 ^{NS}	74.25±1.11 ^d
500	99.66±0.01 ^{NS}	87.68±3.30 ^e

¹⁾ Data were the mean±SD of triplicate experiment.
²⁾ NS means that there is not significant difference among the different concentrations of BHA.
³⁾ * means that there is significant difference between BHA and ethanol extract of *Seoritae* at the same concentration (row) by Student's t-test (p<0.05).
⁴⁾ The different small letters (a~e) mean significant difference among the different concentrations (column) of the sample (p<0.05).

산화 활성의 증가폭이 상당히 높았다. 본 연구에서 서리태 에탄올 추출물은 500 µg/assay(123.76 ppm)의 농도에서 87.68%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타낸 반면, Myung JE와 Hwang IK(2008)의 연구에서는 청자콩 에탄올 추출물이 400 ppm 농도에서 14.06%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내어, 서리태 에탄올 추출물의 항산화 활성이 청자콩 추출물보다 높은 것으로 사료된다. 또한 서리태 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 209.39 µg/assay(51.83 µg/mL)로 나타나, 일반적으로 항산화 활성이 높은 것으로 알려진 베리류인 머루 에탄올 추출물의 IC₅₀값(220 µg/mL)과 식품 및 약재료 이용되는 대추의 IC₅₀값(125 µg/mL)보다도 낮게 나타나(Jeong JA 등, 2007), 이들 물질들 보다 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 사료되었다.

시료의 구성물질 중 hydroxyl group이 포함되어 있을 경우 hydroxyl group이 유리라디칼에 H⁺를 공여하여 유리라디칼의 연쇄 산화 반응을 종결시킴으로써 항산화 작용을 하는 것으로 보고되었으며(Brand-Williams W 1995, Chen JH와 Ho CT 1997, Cheng Z 등 2002, Lee SE 등 2002), 시료의 항산화 활성은 O-H 결합력에 영향을 받는 것으로 보고되었다(Liu BG 등 2010). 따라서 서리태 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼에 대한 높은 전자공여능도 서리태 에탄올 추출물에 유리 라디칼과 반응하기 적합한 구조인 hydroxyl 기를 지니는 화합물이 존재하기 때문인 것으로 추측된다.

3) FRAP법에 의한 환원력

FRAP(Ferric-reducing antioxidant power)법은 총 항산화능을 측정하는 방법 중 비교적 최근에 개발된 방법으로서 Fe^{3+} -TPTZ 복합체가 낮은 산도에서 항산화제에 의해 Fe^{2+} -TPTZ로 환원되는 원리를 이용한 것이다(Choi JI 등, 2009). FRAP법을 이용하여 서리태 에탄올 추출물의 환원력을 측정 한 결과는 Table 3과 같다.

서리태 에탄올 추출물의 환원력은 앞의 DPPH법과 ABTS 법 실험결과와 달리 시료 농도 증가에 따른 항산화 활성의 비례적인 증가는 나타내지 않았다. 서리태 에탄올 추출물은 200 μ g/assay(64.52 μ g/mL)의 농도에서 가장 낮은 환원력을 나타내었고, 400 μ g/assay(129.03 μ g/mL) 이상의 농도에서 환원력이 증가하여 800 μ g/assay(258.08 μ g/mL)의 농도에서는 가장 높은 환원력인 0.84 $FeSO_4$ eq. mM을 나타내었다. 다른 선행연구와 비교해보면 보라들깨와 동글2호 열수 추출물의 환원력은 796 mM/g과 748.62 mM/g으로 보고된 반면(Lee HS 등, 2009), 서리태 에탄올 추출물은 본 실험에서 사용된 가장 낮은 농도인 50 μ g/assay(16.13 μ g/mL)에서 0.22 $FeSO_4$ eq. mM(4.400 mM/g)의 환원력을 나타내어 서리태 에탄올 추출물의 환원력이 더 높은 것으로 나타났다. 또한 Choi JI 등(2009)에 의해 보고된 칠면초 열수 추출물의 경우 0.15 mg/assay(147.59 ppm)의 농도에서 0.27 $FeSO_4$ eq. mM의 환원력을 나타낸 반면, 서리태 추출물은 더 낮은 농도인 400 μ g/assay(129.03 ppm)에서 0.31 $FeSO_4$ eq. mM의 환원력을 보여 서리태 에탄올 추출물의 환원력이 더 높은 것으로 나타났다.

세 가지 방법으로 측정된 서리태 에탄올 추출물의 항산화 활성은 서리태에 함유된 여러 유용물질들의 복합작용으로 사료되는데, 특히 서리태와 같은 검정콩류에 함유된 물질인 플라보노이드계 색소 안토시아닌은 항산화 활성과 높은 관련이 있는 것으로 알려져 있고(Wang SY와 Lin HS 2000, Kanatt SR 등 2005, Kim YH 등 2006, Plochmann KG 2007), 콩에 독특하게 존재하는 isoflavone인 genistein 또한 호중구에 의한 superoxide 생성을 억제시키거나 유해한 활성 산소종을 제거하여 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Kusunoki T 등 1992, Record IR 등 1995). 이 밖에도 Xu JR 등(2007)에 의해 보고된 검정콩의 항산화 활성에 관한 연구 결과에 의하면 검정콩의 폴리페놀 물질과 안토시아닌이 검

정콩의 항산화 활성과 양의 상관관계를 가진다고 하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 시료인 서리태 에탄올 추출물의 항산화 활성은 항산화 물질로 알려져 있고 hydroxyl group을 포함하는 폴리페놀과 플라보노이드 화합물과 관련이 있는 것으로 사료되어 서리태 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

Table 3. Antioxidant activity of the ethanol extract from *Seoritae* by FRAP assay

Concentration (μ g/assay)	FRAP value ($FeSO_4$ eq. mM)	
	BHT	Ethanol extract of <i>Seoritae</i>
50	0.52 \pm 0.06 ¹⁾	0.22 \pm 0.07 * ²⁾
100	1.04 \pm 0.08	0.33 \pm 0.04 *
200	2.17 \pm 0.32	0.17 \pm 0.03 *
400	3.28 \pm 0.23	0.31 \pm 0.03 *
600	3.93 \pm 0.47	0.52 \pm 0.05 *
800	5.22 \pm 0.63	0.84 \pm 0.25 *

¹⁾ Data were the mean \pm SD of triplicate experiment.

²⁾ * means significant difference between BHT and ethanol extract of *Seoritae* at the same concentration (row) by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

2. 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

서리태 에탄올 추출물에 함유된 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 1.65 \pm 0.29 mg/g과 0.59 \pm 0.11 mg/g으로 나타났다(Table 4). Myung JE와 Hwang IK(2008) 등의 연구에서는 서리태에 함유된 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 4.70 mg/g과 2.27 mg/g이라고 하였고, Astadi IR 등(2009)은 두 종류의 검정콩에 함유된 안토시아닌 함량이 11.3 mg/g과 14.5 mg/g이라고 보고하여 본 연구에서 사용한 서리태 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 다소 낮은 것으로 나타났다. 항산화 활성 물질에 대한 선행연구를 보면 검정콩류에 단순 ester형태로 존재하고 있는 phenolic acid가 항산화 물질로 작용하는 것으로 보고되었고(Rice-Ecans CA 등, 1996), Kim SH(2005)에 따르면 검정콩에는 토코페롤과 같은 천연 항산화제도 함유되어 있는데, 그 중 γ -토코페롤이 항산화 활성에 시너지 효과를 부여한다고 보고되었다. Moon 등(2003)에 의한 측정방법에 따른 콩 성분의 항산화 효과 비교에서는 DPPH법으로 항산화 활성을 측정했을 때 gentisic acid와 syringic acid, ferulic acid

Table 4. Contents of total polyphenols and flavonoids of ethanol extract from *Seoritae*

Phytochemical	Contents (mg/g)
Total polyphenols ¹⁾	1.65 ± 0.20 ³⁾
Total flavonoids ²⁾	0.59 ± 0.11

¹⁾ Total polyphenol contents (%) of ethanol extracts from *Seoritae* on galic acid as a standard.

²⁾ Total flavonoid contents (%) of ethanol extracts from *Seoritae* on quercetin as a standard.

³⁾ Data were the mean±SD of triplicate experiment.

등의 phenolic acid의 활성이 높게 나타났고 isoflavones의 효과는 매우 낮게 나타난 것으로 보고되었다. 이와 같은 선행 연구 결과들을 고려할 때 서리태 에탄올 추출물에서도 폴리놀 및 플라보노이드 화합물 이외에 phenolic acid와 토코페롤 등이 항산화 활성에 영향을 줄 수 있는 것으로 사료되었으며, 항산화 활성을 가지고 있는 서리태 성분에 대한 연구들이 더 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한, 항산화 활성에 영향을 미치는 이들 물질들은 항산화 활성뿐만 아니라 산화적 DNA의 손상을 막아 여러 항돌연변이와 항암 활성 등에 유익한 물질로 보고되어 있다(Wei H 등 1993, Wei H 등 1996).

3. 추출물의 암세포 증식 억제 활성

1) MTT assay

MTT assay는 살아있는 세포의 효소작용으로 인해 MTT가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정

하여 암세포의 사멸 또는 증식 억제정도를 측정하는 방법이다(Jeon YH 등 2008b). 각각의 암세포에 대한 서리태 에탄올 추출물의 농도별 암세포 증식 억제 정도를 측정한 결과는 Table 5와 같다.

서리태 에탄올 추출물은 A-549, G-361, HeLa, MCF-7 세포 모두에 대하여 600 ppm의 농도에서 암세포 증식 억제가 크게 증가하기 시작하여 800 ppm의 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제 활성을 나타내었다. 800 ppm에서 A-549와 HeLa에 대한 서리태 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제 활성은 각각 76.48%와 75.67%로 나타나 G-361과 MCF-7에 대한 암세포 증식 억제 활성에 비해 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 이는 Kim SA 등(2005)의 연구에서 김의 에탄올 추출물이 HeLa와 MCF-7에 대해 1,000 µg/assay(약 2,941 ppm)의 농도에서 각각 56.38%와 59.49%의 항암 활성을 나타낸 것보다 더 낮은 농도에서 높은 암세포 증식 억제를 보여준 것으로 서리태 에탄올 추출물은 이 암세포들의 증식을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

2) SRB assay

SRB assay는 살아있는 세포 단백질을 염색하여 세포 독성을 측정함으로써 항암 활성을 평가하는 방법이다(Jeon YH 등 2008b). 서리태 에탄올 추출물의 각 암세포에 대한 농도별 암세포 증식 억제 활성을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 서리태 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제 활성은 4가지 암세포 모두에 대하여 600 ppm의 농도에서 암세포 증식

Table 5. Inhibitory effects of ethanol extract from *Seoritae* on the growth of human cancer cells by MTT assay

Concentration (ppm)	Inhibition activity (%)			
	A-549	G-361	HeLa	MCF-7
50	27.42±1.40 ^{1)(C2)a3)}	8.41±1.84 ^{Bab}	29.67±1.24 ^{Ca}	0.91±2.77 ^{Aa}
100	33.14±2.40 ^{Bb}	13.55±2.75 ^{Ab}	35.04±2.19 ^{Bb}	14.60±1.37 ^{Ab}
200	30.27±2.24 ^{Cab}	10.97±2.57 ^{Aab}	32.35±2.04 ^{Cab}	23.29±5.58 ^{Bc}
400	25.56±2.65 ^{Ba}	6.74±2.95 ^{Aa}	27.93±2.41 ^{Ba}	5.62±2.71 ^{Aa}
600	41.40±3.29 ^{Bc}	20.95±3.42 ^{Ac}	42.78±3.06 ^{Bc}	23.29±5.57 ^{Ac}
800	76.48±3.32 ^{Bd}	52.44±3.72 ^{Ad}	75.67±3.14 ^{Bd}	59.51±4.80 ^{Ad}

¹⁾ Data were the mean±SD of triplicate experiment.

²⁾ The different capital letters (A-C) mean significant difference among the cancer cell lines at the same concentration of the ethanol extract (row) (p<0.05).

³⁾ The different small letters (a-d) mean significant difference among the different concentrations (column) of the ethanol extract in the same cancer cell line (p<0.05).

Table 6. Inhibitory effects of ethanol extract from *Seoritae* on the growth of human cancer cells by SRB assay

Concentration (ppm)	Inhibition activity (%)			
	A-549	G-361	HeLa	MCF-7
50	25.77±1.58 ^{1)(C2)(a3)}	7.33±2.11 ^{Bab}	28.93±1.39 ^{Ca}	0.34±5.18 ^{Aa}
100	31.98±2.47 ^{Bb}	13.12±3.11 ^{Ab}	34.81±2.41 ^{Bb}	12.08±1.55 ^{Ab}
200	28.87±2.24 ^{Cab}	10.22±2.92 ^{Aab}	31.86±2.25 ^{Cab}	21.58±6.16 ^{Bc}
400	23.75±2.94 ^{Ba}	5.44±3.37 ^{Aa}	27.01±2.67 ^{Ba}	2.25±3.09 ^{Aa}
600	40.93±3.58 ^{Bc}	21.47±3.83 ^{Ac}	43.29±3.34 ^{Bc}	21.58±6.16 ^{Ac}
800	78.98±3.51 ^{Bd}	56.96±4.04 ^{Ad}	80.54±3.27 ^{Bd}	56.86±1.61 ^{Ad}

¹⁾ Data were the mean±SD of triplicate experiment.

²⁾ The different capital letters (A-C) mean significant difference among the cancer cell lines at the same concentration of the ethanol extract (row) (p(0,05).

³⁾ The different small letters (a-d) mean significant difference among the different concentrations (column) of the ethanol extract in the same cancer cell line (p(0,05).

억제 활성이 증가하기 시작하여 800 ppm의 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제 활성을 나타냄으로써 앞에서 MTT법으로 측정된 암세포 증식 억제 활성의 결과와 동일한 양상을 나타내었다. 서리태 에탄올 추출물은 가장 낮은 농도인 50 ppm에서 MCF-7(0.34%)에 대한 암세포 증식 억제 활성이 가장 낮게 나타났으며, G-361(7.33%)에 비해서도 A-549(25.77%)와 HeLa(28.93%)에 대한 암세포 증식 억제 활성이 유의적으로 높게 나타났다(p(0,05). 이러한 양상은 가장 높은 농도인 800 ppm에서도 유사하게 나타났다. 서리태 에탄올 추출물의 HeLa(80.54%)와 A-549(78.98%)에 대한 암세포 증식 억제 활성이 G-361(56.96%)와 MCF-7(56.86%)에 대한 암세포 증식 억제 활성보다 유의적으로 높아, 인체 폐암세포인 A-549와 인체 자궁암세포인 HeLa는 서리태 에탄올 추출물 대한 감수성이 높음을 알 수 있었다. 한편 사삼으로 알려져 있는 한약재인 잔대의 에탄올 추출물은 1,000 ppm의 농도에서 HeLa와 MCF-7에 대한 암세포 증식 억제능이 각각 78.5%와 34.88%로 보고된 바 있어(Ham YA 등 2009), 800 ppm의 농도에서 두 암세포에 대해 각각 80.54와 56.86%의 암세포 성장 억제능을 나타낸 서리태 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제 활성이 더 높을 가능성이 있음을 보여주었다.

IV. 요약

본 연구에서는 서리태 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측

정하고, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석하였으며, MTT 및 SRB assay를 통한 암세포 증식 억제 활성을 측정하였다. 서리태 에탄올 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼에 대한 전자공여능은 500 µg/assay의 농도에서 각각 63.75%와 87.68%로 나타났고, IC₅₀ 값은 각각 385.39 µg/assay와 209.39 µg/assay로 나타났으며, 항산화 활성 물질로 알려져 있는 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 1.65 mg/g과 0.59 mg/g으로 분석되었다. 또한 서리태 에탄올 추출물(800 ppm)은 MTT assay에서 인체 폐암세포인 A-549에 대해 76.48%의 암세포 증식 억제 활성을 나타내었고, SRB assay에서 인체 자궁암세포인 HeLa에 대해 80.54%의 암세포 증식 억제 활성을 나타내었다. 이들 결과는 서리태 에탄올 추출물이 높은 항산화 활성과 우수한 암세포 증식 억제 활성을 가지고 있음을 나타낸 것으로 서리태 에탄올 추출물의 천연 기능성 소재로서의 이용 가능성을 보여주었다.

V. 감사의 글

본 연구는 경북대학교특성화사업비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 오상진. 2005. 인체노화. 탐구당. 서울. pp 204-205
- 지희연, 김선림, 허은숙. 2007. 검정콩으로 제조한 청국장과 메주의 항산화 효과 및 아질산염 소거효과. 한국작물학회 학술발표대회 논문집 11(1):258
- Arai S, Morinaga Y, Yoshika T, Ichiishi E, Kiso Y, Yamazaki M. 2002. Recent trends in functional foods science and industry in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(10):2017-2029
- Astadi IR, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. 2009. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem* 112(3):659-663
- Bae EA, Moon GS. 1997. A study on the antioxidative of Korean soybeans. *J Korean Soc Food Sci Nut* 26(2):203-208
- Bandoniene D, Pukalskas A, Venskutomis PR, Gruzdiene D. 2000. Preliminary screening of antioxidants of some plants extracts in rapeseed oil. *Food Res Intl* 23:785-791
- Benzie F, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 239(1):70-76
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature* 81(4617):1199-1200
- Brand-Williams W, Cubelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 28(1):25-30
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS* 52:59-63
- Camichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Chen JH, Ho CT. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45(7):2374-2378
- Cheng Z, Ren J, Li Y, Chang W, Chen Z. 2002. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorg Med Chem* 10:4067-4073
- Choi JI, Kim YJ, Kim JH, Song BS, Yoon YH, Byun MW, Kwon JH, Chun SS, Lee JW. 2009. Antioxidant Activities of the Extract Fractions from *Suaeda japonica*. *J Korean Soc Food Sci Nut* 38(2):131-135
- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. *J Natl Cancer Inst* 66(6):1191-1308
- Han SH, Woo NRY, Lee SD, Kang MH. 2006. Antioxidative and antibacterial activities of endemic plants extracts in Korea. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14(1):49-55
- Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. 2009. Antimutagenic and anti tumor effect of *Adenophora triphylla* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nut* 38(1):25-31
- Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 70(2):343-352
- Jeon YH, Kil JH, Lim SM, Kim MH, Kim MR. 2008a. Analysis of antioxidative activity and antimutagenic effect of ethanol extract from *Schizandra Chinensis Baillon*. *J East Asian Soc Dietary Life*. 18(5):746-752
- Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008b. Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus Officinalis*. *J Korean Soc Food Sci Nut* 37(1):1-7
- Jeong JA, Kwon SH, Kim YJ, Shin CS, Lee CH. 2007. Investigation of antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of the seed extracts. *Korean J Plant Res* 20(2):177-184
- Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Beak NI. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Appl Bio Chem* 47(1):135-140
- Kanatt SR, Chander R, Radhakrishna P, Sharma A. 2005. Potato peel extract a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J Agric Food Chem* 53:1499-1504
- Kim HS, Hong MJ, Kang IY, Jung JY, Kim HK, Shin YS, Jun HJ, Suh JK, Kang YH. 2009. Radical scavenging activities and antioxidant constituents of oriental melon extract. *J Bio-Environment Control* 18(4):442-447
- Kim KS, KimMJ, Lee KA, Kwon DY. 2003. Physico-chemical properties of Korean traditional soybeans. *J Korean Food Sci Technol* 35(3):335-341
- Kim MH, Kim JB, Lee SY, Kim CY, Lee JR. 2008. Quantification of tocopherols and phytosterols from the Korean native soybeans germplasm. *Korean J Intl Agri* 20(4):296-300
- Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, MS Lee. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweed. *J Korean Soc Food Sci Nut* 34(4):451-459
- Kim SH, Kwon TW, Lee YS, Choung MG, Moon GS. 2005. A major antioxidative components and comparison of antioxidative activities

- in black soybean, J Korean Food Sci Technol 37(1):73-77
- Kim SH, Lim SB, Ko YH, Oh CK, Oh MC, Park CS. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. Bull Korean Fish Soc 27(5):462-468
- Kim YH. 1999. Chemical composition and hardness of black-colored soybean seed. Soonchunhyang J Nat Sci 5(2):301-306
- Kim YH, Lee JH, Lee YS, Yun HT . 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. Korea Soybean Digest 23(1):1-9
- Kim YH, Kim DS, Woo SS, Kim HH, Lee YS, Kim HS, Ko KO, Lee SK. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity on human cancer cells of anthocyanin extracted from black soybean. J Korean Crop Sci 53(4):407-412
- Kusunoki T, Higashi H, Hosai S, Hata D, Sugie K, Mayumi M, Migawa H. 1992. Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG. Biochem Biophys Res Com 183:789-796
- Lee HS, Lee HA, Hong CO, Yang SY, Hong SY, Park SY, Lee HJ, Lee KW. 2009. Quantification of caffeic acid and rosmarinic acid and antioxidant activities of hot-water extracts from leaves of *Perilla frutescens*. J Korean Food Sci Technol 41(3):302-306
- Lee SE, Seong NS, Park CG, Seong JS. 2002. Screening for antioxidative activity of oriental medicinal plant materials. J Korean Medicinal Crop Sci 10(3):171-176
- Liu BG, Yang JG, Guo Y, Ning ZX, Gao JH. 2010. Division of antioxidant functional regions of flavonoids based on quantum chemistry analysis. 食品科學 31(15):167-170
- Moon GS, Kwon TW, Ryu SH. 2003. Comparison of antioxidative activities of soybean components by different assays. Korean Soybean Digest 20(1):28-36
- Myung JE, Hwang IK. 2008. Functional components and antioxidative activities of soybean extracts. Korea Soybean Digest 25(1):23-29
- Nieva Moreno MI, 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
- Park YO, Lim HS. 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa Borealis*) leaf extract according to extraction solvent. J Korean Soc Food Sci Nutr 38(12):1640-1648
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying, 2'-Azinobis (3-ethylenebenzo thiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Methods Enzymol 299:379-389
- Plochmann K, Korte G, Koutsilieris E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, Schreier P, Scheller C. 2007. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. Arch Biochem Biophys 460(1):1-9
- Record IR, Dreosit IE, McInemey JK. 1995. The antioxidant activity of genistein *in vitro*. J Nutr Biochem 6:481-485
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannaiia A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med 26 (9-10):1231-1237
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Inhibition of UV light and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. Carcinogenesis 17:73-77
- Shin HC, Sung HS, Lee YS, Sohn HS. 2001. Nutritional adequacy and beneficial effects of soy formula. Korea Soybean Digest 18:10-25
- Sohn Jh, Choung MG, Choi HJ, Jang UB, Sohn GM, Byun MW, Choi C. 2001. Physiological effect of Korean black soybean pigment. J Korean Food Sci Technol 33(6):764-768
- Wang SY, Lin HS. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J Agric Food Chem 48:140-146
- Wei H, Cai Q, Rahn RO. 1996. Inhibition of UV light and fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. Carcinogenesis 17:73-77
- Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowen R, Barnes S. 1993. Inhibition of tumor promotor-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. Nutr Cancer 20:1-12
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. 1999. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food Chem Toxicol 37:1027-1038
- Xu JR, Zhang MW, Liu XH, Liu ZX, Zhang RF, Sun L, Qiu LJ. 2007. Correlation between antioxidation and the content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. Agric Sci China 6(2):150-158
- Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem 43:27-32