

Broccoli flower와 Broccoli sprout의 라디칼 소거능 및 산화적 스트레스 개선 효과

김현영¹ · 이영아² · 조은주^{2*}

¹경남과학기술대학교 식품과학부, ²부산대학교 식품영양학과 및 노인생활환경연구소

Free radical scavenging effect and protective activity from oxidative stress of broccoli flowers and sprouts

Hyun Young Kim¹, Young A Lee², Eun Ju Cho^{2*}

¹Department of Food Science and Nutrition & Research Institute of Ecology for the Elderly, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Received on 25 January 2012, revised on 3 February 2012, accepted on 23 March 2012

Abstract : In this study, the antioxidative effect and protective potential against oxidative damage of extract and fractions from broccoli were investigated under *in vitro* and cellular system. The methanol (MeOH) extracts of broccoli flowers and sprouts were partitioned as dichloromethane, *n*-butanol (BuOH) and aqueous fractions. The comparison of antioxidative effect of broccoli flowers and sprouts showed that broccoli sprouts exerted the more effective protective activity from 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in LLC-PK₁ porcine renal epithelial cell. In addition, the extract and fractions from broccoli sprouts showed strong scavenging effect of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and the BuOH fraction exerted the strongest activity. Therefore, the BuOH fraction was evaluated as the most active fraction with strong radical scavenging activity among the fractions of broccoli flowers and sprouts. The present study suggests the antioxidative potential against free radical-induced oxidative damage of flowers and sprouts of broccoli. In addition, the BuOH fraction of broccoli is considered as the active fraction with antioxidative effect.

Key words : Broccoli flower, Broccoli sprout, DPPH, Oxidative stress, LLC-PK₁ renal epithelial cell

I. 서론

인체내의 대사과정에서 superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂), hydroxyl radical (-OH), peroxy radical(ROO) 등의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데, 세포나 세포소기관에 손상을 초래하고 생체내 단백질의 기능 저하를 초래할 뿐만 아니라 각종 질환의 원인이 되기도 한다(Fridovich, 1978; Kodama, 1988). 또한 최근에는 ROS와 함께 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)이 주목 받고 있다. RNS에는 nitric oxide(NO), nitrogen dioxide(NO₂), peroxyxynitrite(ONOO⁻), alkyl peroxyxynitrites(LOONO) 등

이 있으며, 특히 NO와 O₂⁻과의 반응으로 생성되는 대사산물인 ONOO⁻는 전구체보다 훨씬 강력한 반응성으로 광범위한 생체 분자의 산화적 손상 및 mitochondria 손상을 야기시킨다(Darley -Usmar 등, 1995; Halliwell 등, 1999; Patel 등, 1999).

ROS 및 RNS와 같은 유리기 과다 생성은 생체 내 항산화 방어 시스템과 유리기 생성계의 불균형을 유발하여 산화적 스트레스를 증가시켜 세포의 항상성 상실을 가져오므로 노화를 비롯하여 암, 동맥경화증, 당뇨병 등 많은 질환들을 초래하는 것으로 여겨진다(Chung 등, 2000; Cutler, 1985; Sarkar와 Fisher, 2006; Willcox 등, 2004). ROS와 RNS에 의한 손상을 개선시키기 위한 항산화 방어 시스템에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase 같은 활성산소 제거 효소에 의해 조절되는 항

*Corresponding author: Tel: +82-51-510-2837

E-mail address: ejcho@pusan.ac.kr

산화시스템과 주로 음식을 통해 섭취하는 β -carotene, 비타민 C 및 비타민 E 등의 비효소적인 항산화 시스템이 존재한다. 최근 들어 산화적 스트레스가 다양한 질환의 원인이 되고 있음이 밝혀져 이를 개선시킬 수 있는 항산화제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는데, 특히 식품을 통해 섭취하는 천연 항산화제가 유해성은 적으면서 효과적인 것으로 여겨지고 있다(Kuhn, 2003; Warnholtz와 Munzel, 2000).

이 중 채소류는 vitamin C, E 뿐 만 아니라 carotenoid, lycopene, flavonoid와 phenolic compound 등의 다양한 천연 항산화제가 함유되어 있어 산화적 스트레스에 의한 만성 퇴행성 질환의 위험을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Gillman 등, 1995; Joshipura 등, 2001; Rimm 등, 1996; Steinmetz와 Poter, 1996). 특히 broccoli, cabbage, cauliflower, brussels sprouts와 같은 십자화과 채소류에는 우수한 천연 항산화 물질인 glucosinolate가 다량 함유되어 있다(Fenwick 등, 1983). 대표적인 십자화과 채소인 broccoli의 항산화 효과를 비롯한 다양한 생리활성이 보고되고 있으나(Nardini 등, 1995; Vang 등, 1995), broccoli flower와 broccoli sprout의 산화적 스트레스 개선 효과를 비교한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 broccoli flower와 broccoli sprout의 항산화 효과를 비교해 봄으로써 broccoli 섭취를 통한 효과적인 천연 항산화제 이용 가능성 및 그 효율성을 살펴보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료와 추출물 및 분획물 제조

Broccoli flower와 broccoli sprout는 부산시 동래시장에서 구입하여 사용하였으며, 흐르는 물로 깨끗이 씻고 동결건조 한 다음 분말화 하였다. 건조한 broccoli를 시료 중량의 20배의 methanol(MeOH)로 12시간 동안 추출하는 과정을 3회 반복한 후 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축시켜 MeOH 추출물을 얻었다. 또한 broccoli MeOH 추출물을 시료 중량의 2배의 증류수에 녹인 후 dichloromethane (CH_2Cl_2), *n*-butanol(BuOH)로 3회씩 반복 추출하여 CH_2Cl_2 , BuOH 및 aqueous(H_2O) 회분을 조제하였다. 이 회분들은 감압 농축 후 동결 건조하여 -80°C 의 냉동실에 보관하면서

실험에 사용하였다.

2. 세포와 시약 및 기기

LLC-PK₁(porcine renal epithelial cell)은 ATCC(Solon, Ohio, USA)에서, 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle medium/nutrition mixture F-12(DMEM/F-12)과 fetal bovine serum(FBS)는 Invitrogen Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 배양은 5% CO₂ incubator를 사용하였다.

3. DPPH 소거 효과

Ethanol(EtOH)에 녹인 각 농도별 시료 100 μL 와 60 μM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액 100 μL 를 96-well plate에 주입하여 혼합해서 30분간 실온에 방치한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Hatano 등, 1989). 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼의 소거효과를 백분율과 IC₅₀(DPPH radical 생성을 50%까지 억제하는데 필요로 하는 샘플 농도)로 나타내었다.

4. 세포 배양

LLC-PK₁ cell은 DMEM/F-12가 함유된 5% FBS를 이용하여 37°C , 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하여 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 다시 배양하여 실험하였다.

5. Cell viability 측정

세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 well 당 10^4 cells/mL로 seeding하여 2 hr 후 1 mM 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride(AAPH)를 24시간 처리하였다. 그 후 시료를 농도별로 처리하여 24 hr 동안 동

일한 조건에서 배양한 후, 1 mg/mL의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) solution을 각 well에 50 μ L씩 주입하여 37°C에서 4 hr 재배 양한다. Medium에서 MTT solution을 제거하고 formazan 결정을 100 μ L dimethylsulfoxide에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Mosmann, 1983).

Cell viability(%)=(OD₅₄₀ of AAPH or sample treated cells/ OD₅₄₀ of AAPH nontreated cells)×100

6. 통계분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고(n=5), 대조군과 실험군의 실험 결과는 one way ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 유의수준 0.05에서 유의성을 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

Cao 등은 식품의 항산화능 비교 지표로써 사용되는 oxygen radical absorbance capacity를 통해 항산화 활성이 우수한 13가지 채소류를 선정하였다(Cao 등, 1996; Vinson 등, 1998). 이 중 예비실험에서 비교적 우수한 항산화능을 보인 broccoli flower는 대표적인 십자화과 채소로 flavonol glucosides, hydroxycinnamic acid 그리고 glucosinolate와 같은 황 함유 성분이 많은 것으로 보고되고 있다(Plumb 등, 1997). 특히 glucosinolate에서 유도된 sulforaphane 등은 phase 2 enzyme 유도 효과가 있으며 이 효과는 broccoli 발아 이후 합성되는 것이 아니므로 broccoli가 성숙함에 따라 오히려 그 활성 농도는 감소하게 된다(Nestle, 1997). 따라서 싹 채소의 적은 양이 성숙한 채소의 많은 양의 활성에 적용될 수 있을 뿐 아니라 그 외 vitamin이나 양질의 protein 함량 등에 있어서도 싹 채소의 영양학적 가치가 높은 것으로 보고되고 있다(Fahey 등,

1997; Lintschinger 등, 2000). 따라서 본 연구에서는 broccoli flower와 broccoli sprout의 항산화 효과를 비교해 봄으로써 broccoli 섭취를 통한 효과적인 천연 항산화제 이용 가능성 및 그 효율성을 비교하고자 하였다.

Broccoli flower와 broccoli sprout의 보다 효과적인 활성 비교를 위해 분획을 실시하였으며 추출물 및 분획물의 수율은 Table 1에 나타내었다. Broccoli flower는 MeOH 추출물을 100.0%(20.0 g)로 볼 때 CH₂Cl₂ 획분은 22.5%(4.5 g), BuOH 획분은 27.5%(5.5 g), H₂O 획분은 42.0%(8.4 g)이었으며, broccoli sprout는 MeOH 추출물을 100%(20.0 g)으로 볼 때 CH₂Cl₂ 획분은 19.5%(3.9 g), BuOH 획분은 15.0%(3.0 g), H₂O 획분은 58.0%(11.6 g)으로 나타나 CH₂Cl₂ 획분과 BuOH 획분의 수율 면에서는 broccoli flower가 broccoli sprout보다 효율적인 것으로 나타났다.

LLC-PK₁ 신장 상피 세포는 nephron에서 유도된 MDCK cell보다 산화적 스트레스에 더 민감하며, oxidant에 의한 sodium-dependent glucose와 phosphate transport의 간섭으로 인해 ion gradient를 붕괴시키고 이로 인해 ATP 결핍과 Na⁺-K⁺-ATPase의 불활성화를 유도하며 cell injury를 유도하는 것으로 보고되고 있으며, 특히 초기 cytotoxicity에 있어서는 lipid oxidation이 중요한 요인으로 생각되어 지고 있다(Andreoli와 Mallett, 1997; Andreoli 등, 1993). 이처럼 산화적 스트레스에 민감한 LLC-PK₁ cell에 radical generator인 AAPH를 처리하여 산화적 스트레스를 가하고 이에 대한 개선 효과를 통해 cell damage에 대한 보호효과를 비교해 볼 수 있다. Free radical generator로 사용된 AAPH는 다른 효소의 작용이나 생리적인 변화없이 단분자적으로 변성이 된다. 이렇게 변성된 AAPH는 두 carbon radical과 질소로 분해되는데 이 carbon radical은 다른 carbon radical과 다시 결합하여 안정적인 구조를 취하기도 하지만 대부분은 산소와 반응하여 peroxy radical을 생성하게 되며, 이 peroxy radical은 protein, lipid 또는 cell에 산화적 스트레스를 주는 요인으

Table 1. Comparison of yields for extract or fractions from broccoli flower and broccoli sprout.

Material	Broccoli flower		Broccoli sprout	
Raw sample	570 g		612 g	
MeOH extract	20.0 g	100.0%	20.0 g	100.0%
CH ₂ Cl ₂ fraction	4.5 g	22.5%	3.9 g	19.5%
BuOH fraction	5.5 g	27.5%	3.0 g	15.0%
H ₂ O fraction	8.4 g	42.0%	11.6 g	58.0%

로 작용하게 된다(Niki, 1990).

Table 2는 LLC-PK₁ cell에 AAPH를 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 broccoli flower와 sprout의 개선 효과를 검토한 결과이다. Control에서는 AAPH에 의해 세포생존율이 61.3%로 감소하였으나, broccoli flower와 broccoli sprout의 각 분획물 처리후 농도 의존적인 viability의 상승을 나타냈으며, broccoli sprout의 경우 저농도인 5 µg/mL로 처리하였을 때 모든 획분에서 70% 이상의 viability를 보인 반면, broccoli flower는 broccoli sprout에 비해 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 특히 BuOH 획분은 broccoli flower와 broccoli sprout에서 가장 우수

한 산화적 스트레스 개선효과를 보이는 활성 획분층으로 생각되어진다. Broccoli flower와 broccoli sprout의 BuOH 획분을 50 µg/mL로 처리하였을 때 각각 83.5%와 85.1%의 세포생존율을 나타내었다(Table 2). 항산화 활성이 우수한 broccoli sprout를 이용하여 MeOH 추출물과 CH₂Cl₂, BuOH, H₂O 획분의 DPPH 라디칼 소거 효과를 IC₅₀로 살펴 본 결과(Table 3), 각각 47.16 µg/mL, 63.86 µg/mL, 19.32 µg/mL, 104.32 µg/mL을 나타내어, 각 획분중 BuOH 획분이 가장 우수한 라디칼 소거능이 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 broccoli flower에 비해 sprout가 더 우수한 산화적 스트레스 개선 효과가 있음을 할 수 있었다.

Table 2. Effect of fractions from broccoli flower and broccoli sprout on viability of LLC-PK₁ cells treated with AAPH.

Treatment(µg/mL)	Cell viability (%)	
	Broccoli flower	Broccoli sprout
AAPH-treated control	61.3 ± 2.0 ^b	61.3 ± 0.8 ^b
MeOH	60.3 ± 3.2 ^b	74.3 ± 1.0 ^a
CH ₂ Cl ₂	59.0 ± 5.5 ^b	71.3 ± 3.3 ^a
BuOH	80.6 ± 1.9 ^a	77.3 ± 1.9 ^a
H ₂ O	58.7 ± 3.4 ^b	77.0 ± 1.0 ^a
AAPH-treated control	61.3 ± 2.0 ^{c,d}	61.3 ± 0.8 ^d
MeOH	64.9 ± 1.8 ^b	74.4 ± 1.8 ^{b,c}
CH ₂ Cl ₂	64.0 ± 0.9 ^{b,c}	72.2 ± 1.5 ^c
BuOH	83.2 ± 2.4 ^a	83.4 ± 1.2 ^a
H ₂ O	59.2 ± 1.7 ^d	78.2 ± 2.4 ^b
AAPH-treated control	61.3 ± 2.0 ^c	61.3 ± 0.8 ^c
MeOH	69.9 ± 0.9 ^b	76.9 ± 0.4 ^b
CH ₂ Cl ₂	64.6 ± 0.8 ^c	76.7 ± 0.5 ^b
BuOH	83.5 ± 2.8 ^a	85.1 ± 0.1 ^a
H ₂ O	64.1 ± 3.2 ^c	79.7 ± 2.0 ^b
Normal	100.0 ± 3.8	100.0 ± 2.5

Values are mean ± SD.

^{a-d}Means with the different letters among the same part of broccoli and concentraion are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 3. DPPH radical scavenging effect of fractions from broccoli sprout.

Fraction	IC50 (µg/mL)
MeOH	47.16 ± 0.52
CH ₂ Cl ₂	63.86 ± 5.90
BuOH	19.32 ± 0.99
H ₂ O	104.38 ± 4.32
Ascorbic acid	0.92 ± 0.03

Values are mean ± SD.

The solvent used in this experiment is 50% EtOH solution.

IC₅₀ is concentration in µg/mL required to inhibit DPPH radical formation by 50%.

Sprout 부분이 flower에 비해 우수한 항산화 활성을 나타낸 것은 싹채소의 경우가 더 많은 양의 영양성분을 함유하고 있고, 특히 broccoli의 활성성분으로 알려진 glucosinolate의 양이 broccoli 발아 이후 성숙과정에서 감소하는 것과 관련있는 것으로 사료된다. 특히 획분 중 BuOH 획분이 다른 획분에 비해 라디칼 소거능과 AAPH에 의한 LLC-PK₁ cell의 산화적 스트레스 개선효과가 뛰어나 활성 획분층으로 사료된다.

IV. 결론

본 연구에서는 broccoli flower와 broccoli sprout의 MeOH 추출물을 CH₂Cl₂, BuOH 및 H₂O 획분으로 분획하여 각 획분층의 라디칼 소거능과 LLC-PK₁ cell을 이용한 산화적 스트레스 개선효과를 살펴보았다. LLC-PK₁ cell을 이용한 실험에서 broccoli sprout가 broccoli flower에 비해 AAPH에 의한 산화적 스트레스 개선 효과 우수하였으며, 각 획분층 BuOH 획분이 가장 뛰어난 효과를 보여, broccoli flower와 broccoli sprout의 BuOH 획분을 50 µg/mL로 처리하였을 때 각각 83.5%와 85.1%의 세포생존율을 나타내었다. 또한 broccoli sprout의 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거능이 우수하였으며, 특히 BuOH 획분의 경우 19.32 µg/mL의 IC₅₀ 값을 나타내었다. 이상의 결과로부터 broccoli flower에 비해 broccoli sprout의 항산화활성이 우수함을 알 수 있었으며 각 획분층 BuOH 획분이 라디칼 소거능과 peroxy radical에 의한 산화적 스트레스 개선효과가 가장 우수하여 활성 획분층으로 사료된다.

참고 문헌

Andreoli SP, Mallett CP. 1997. Disassociation of oxidant-induced ATP depletion and DNA damage from early cytotoxicity in LLC-PK₁ cells. *Am. J. Physiol.* 272: F729-F735.

Andreoli SP, McAteer JA, Seifert SA, Kempson SA. 1993. Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK₁ cells: mechanisms of injury. *Am. J. Physiol.* 265: F377-F384.

Cao G, Sofic E, Prior RL. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3426-3431.

Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, Yu BP. 2000. The inflammatory process in aging. *Rev. Clin. Gerontol.* 10: 207-222.

Cutler RG. 1985. Antioxidant and longevity of mammalian species. *Basic Life Sci.* 35: 17-73.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. 1984. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369: 131-135.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369: 131-135.

Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10367-10372.

Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18: 123-201

Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.

Gillman MW, Cupples LA, Gagnon D, Posner BM, Ellison RC, Castelli WP, Wolf PA. 1995. Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. *JAMA.* 273: 1113-1117.

Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good. *Free Radic. Res.* 31: 651-669.

Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2016-2021.

Joshiyura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 134: 1106-1114.

Kodama M. 1988. Role of oxygen species in carcinogenesis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 33: 3136-3143.

Kuhn M. 2003. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am. J. Nutr.* 103: 58-62.

Lintschinger J, Fuchs N, Moser J, Kuehnelt D, Goessler W. 2000. Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5362-5368.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.

Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Felice MD, Scaccini C. 1995. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 541-552.

Nestle M. 1997. Broccoli sprouts as inducers of carcinogen-detoxifying enzyme systems: clinical, dietary, and policy implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11149-11151.

- Niki E. 1990. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Meth. Enzymol.* 186: 100-108.
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1411: 385-400.
- Plumb GW, Price KR, Rhodes MJ, Williamson G. 1997. Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radic. Res.* 27: 429-435.
- Rimm EB, Ascherio A, Giovannucci E, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. 1996. Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA.* 275: 447-451.
- Sarkar D, Fisher PB. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.* 236: 13-23.
- Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet Assoc.* 96: 1027-1039.
- Vang O, Rasmussen BF, Sorensen H. 1995. Effects of dietary broccoli on antioxidant enzymes. *Clin. Chem.* 41: 1910-1911.
- Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3630-3634.
- Warnholtz A, Munzel T. 2000. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 1: 38-40.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004. Antioxidant and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 275-295.