

## 갈근추출물의 항산화 활성 및 멜라닌세포 효과에 관한 연구

문지선<sup>a†</sup> · 이진희<sup>b</sup> · 김영배<sup>c</sup>

중원대학교 뷰티헬스학과<sup>a†</sup>, 동국대학교 문화서비스학과<sup>b</sup>,  
동방문화대학원대학교 자연치유학과<sup>c</sup>  
(2017년 5월 26일 접수: 2017년 6월 19일 수정: 2017년 6월 27일 채택)

### Study of antioxidation activity and melanocyte effect of *Pueraria Lobata* Root Extract

Ji-sun Moon<sup>a†</sup> · Jin-Hee Lee<sup>b</sup> · Young-Bae Kim<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Beauty Health, Jungwon University, 85, Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun,  
Chungbuk, 28024, Korea

<sup>b</sup>Department of Culture Service, Dongguk University, 30, Pildong-ro 1-gil, Jung-gu, Seoul, Korea

<sup>c</sup> Department of Natural Healing, Dongbang Culture University, 60, Seongbuk-ro 28-gil,  
Seongbuk-gu, Seoul, Korea 02838

(Received May 26, 2017; Revised June 19, 2017; Accepted June 27, 2017)

**요약** : 본 연구는 갈근 추출물의 항산화 활성 및 멜라닌세포 효과를 평가하기 위하여 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거 활성을 통하여 항산화 활성을 살펴보고, B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성 및 멜라닌 생합성 억제능 효과를 측정하였다. 연구 결과 B16F10 melanoma 세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며, B16F10 melanoma 세포에  $\alpha$ -MSH로 멜라닌 생성을 유도한 후 멜라닌 생합성 억제능을 측정한 결과 멜라닌의 생성 증가가 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 항산화 활성에 대한 결과로는, 갈근 추출물은 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 높아 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 갈근 추출물이 항산화 활성과 멜라닌세포에 대한 멜라닌생성억제 효과가 뛰어나고 피부 세포에 대한 독성이 낮으며, 피부의 멜라닌 세포에 대한 안전성이 확인됨에 따라 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

**주제어** : 갈근, 항산화 활성, 화장품, 멜라닌세포, 플라보노이드

**Abstract** : This study investigated antioxidation activity through the content of total polyphenol, that of flavonoid and DPPH radical scavenging activity and measured the cytotoxicity against B16F10 melanoma and inhibiting function of melanin biosynthesis to evaluate antioxidation activity and melanocyte effect of pueraria lobata root extract. As the results of study, it was recognized

---

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: mjs@jwu.ac.kr)

that the toxicity did not show against B16F10 melanoma and the increase of generating melanin was inhibited as the results of measuring the inhibition function of melanin biosynthesis after inducing the generation of melanin by  $\alpha$ -MSH against B16F10 melanoma cell. The high contents of polyphenol and flavonoid was found as the contents of pueraria lobata root extract increases and DPPH radical scavenging activity as the results of antioxidation activity. Through this study, it was recognized that pueraria lobata root extract has the feasibility that can be used as the material of cosmetics as it has the excellent effect of antioxidation activity and inhibiting the generation of melanin against melanocyte, low toxicity against skin cell and its safety against melanocyte of skin was found.

*Keywords* : Pueraria lobata, Antioxidant, Cosmetics, Melanocyte, Flavonoid

## 1. 서론

인체의 노화 요인에는 다양한 요인이 있지만 그 중 환경적인 요인을 무시할 수 없으며, 특히 활성산소는 세포의 파괴, 피부질환 및 피부노화 여러 가지 형태로 노화를 촉진시키고 질병을 유도하는 원인중 하나로 알려지고 있다. 이러한 활성산소를 제거하기 위한 한약재 등 여러 가지 추출물들이 검증되어 사용 중인 생약 추출물을 활용한 항산화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[1]. 고령화 시대로 접어들면서 건강하고 생활 수준의 향상과 더불어 나이를 먹는 것에 대한 인식이 많이 바뀌고 있으며, 기능성 식품분야와 화장품분야의 시장 규모가 확대되고, 천연물을 활용한 연구는 꾸준히 진행되고 있다[2]. 항산화제로 사용되는 페놀계 합성 항산화제인 BHA (butylated hydroxyl anisol)와 BHT(butylated hydroxyl toluene)는 효과 대비 경제성과 안전성으로 널리 사용하고 있다[3]. 항산화 기능을 가지는 화합물은 polyphenol 물질들로서 천연 항산화제로 알려져 있으며, 이러한 polyphenol 화합물은 주로 항산화 활성과 금속 복합체를 형성하는 기능을 갖고 있다[4]. 천연물에 존재하는 대표적인 항산화 물질로는 6가지가 있다. 이는 lutathione[5], ascorbic acid[6], flavonoids[7], tocopherol[8], carotenoids[9], phenolic compounds[10] 등 알려져 있으나, 일부의 물질을 제외하고는 실용적으로 사용되는 경우는 없기 때문에 효과적인 항산화제 개발을 위해서는 독성이 낮은 천연물이 보다 광범위한 연구가 필요한

실정이며, 항산화 성분은 높고, 경제적이고 안전한 천연 항산화제의 개발에 관심이 증가 하고 있다[11].

본 연구 사용한(*Pueraria Lobata*)은 예로부터 식용으로 응용되어 왔으며, 다년생 콩과(Leguminosae)에 속하는 칩의 주피를 제거한 것으로 發表透疹,生津,止瀉의 효능이 알려져있다[12]. 이외에도 혈압작용[13], 항염증효과[14], 항산화효과[15], 해열작용[16], 간보호작용[17], 골다공증[18] 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 주 성분으로는 irisolidone, genistein, daidzein, biochanin A 등의 isoflavonoid계열의 화합물과 quercetin등의 flavonoid 계열화합물이며[19], 특히 flavonoid 계열의 화합물들은 관상동맥 확장 작용, 동맥 경련을 막아주며 물에 달인 물은 혈압 강하작용을 알코올추출물은 해열작용을 가진다고 알려져 있다[20, 21]. 이외에도 oleanene-type의 triterpene glycoside로서, kudzusaponins A1, A2, A3가 보고되어 있으며, soyasaponin 등이 함유되어 있다[22]. 한방에서는 칩뿌리를 절편으로 해서 말린 것을 갈근이라고 하여 소염, 해열, 진통 등에 활용된다[23]. 본 연구에서는 갈근 추출물의 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능, 총 폴리페놀을 통한 항산화 활성을 알아보고, B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성 및 멜라닌 생합성 억제능 효과를 살펴보고자 한다. 건강 기능식품 연구 및 화장품 기능성 소재 개발의 목적으로 이들의 소비 효용성을 높이고 이에 기초자료를 제시함으로써 천연 항산화제의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

#### 2.1.1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 시약은 다음과 같다. 세포 실험에 사용된 시약 ascorbic acid, NR solution, Folin-Denis reagent, caffeic acid, potassium acetate, aluminum nitrate, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, PBS (phosphate buffered saline solution) 등 Sigma Chemical (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 2.1.2. 시료 준비

본 실험에 사용된 갈근은 건조하여 70% ethanol용액에 10배의 무게를 가한 후 37°C incubator 안에서 72시간 추출하였다. 추출액만을 분리하기 위하여 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 감압 농축을 통해 ethanol을 제거한 뒤 최종 extract를 얻어 본 실험에 사용하였다.

#### 2.1.3. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 B16F10 melanoma 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 배양 시에는 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA)에 사용하였으며, 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA), 1% penicillin/streptomycin (100 IU/ 50 mg/mL)이 첨가하여 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 습윤 incubator에서 배양하였다.

### 2.2. 실험 방법

#### 2.2.1. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical 소거 활성은 blois의 방법[24]을 수정하여 항산화력 측정을 시행하였다. 갈근 추출물을 농도별로 희석한 후 96 well plate에 10 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, Sigma-Aldrich, USA)용액 180  $\mu$ L와 시료액 20  $\mu$ L를 혼합하여 차광 상태에서 37°C, 30분간 반응시킨

후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였으며, 양성 대조군으로는 Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거 활성(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{첨가된 흡광도}}{\text{무첨가된 흡광도}} \times 100 \right\}$$

#### 2.2.2. Polyphenol 함량 측정

Polyphenol 함량 측정은 Folin-Denis 방법[25]을 변형 및 수정하여 비색 정량하였다. 갈근 추출물을 각 농도별로 희석한 후 시료 400  $\mu$ L와 Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, USA) 400  $\mu$ L를 혼합하여 3분간 실온에서 반응시켰다. 반응 시킨 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Samchun, Korea)를 400  $\mu$ L를 혼합하여 암실에서 60분 반응시킨 후 상등액 200  $\mu$ L씩 96 well plate에 분주하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였으며, 표준물질 caffeic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 표준 검량선을 작성한 후, 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

#### 2.2.3. Flavonoid 함량 측정

Flavonoid 함량 측정은 Moreno방법 수정 및 변형하여 측정하였다[26]. 갈근 추출물을 각 1, 2.5, 5, 10 mg/mL로 희석한 후 시료 100  $\mu$ L와 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich, USA) 20  $\mu$ L, 1M potassium acetate (Sigma-Aldrich, USA) 20  $\mu$ L, ethanol (Duksan, Korea) 860  $\mu$ L를 차례로 혼합하여 실온에서 40분간 방치 후 원심분리기로 부유물을 가라앉힌 후 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였으며, 표준물질 quercetin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 표준 검량선을 작성한 후, 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

#### 2.2.4. 세포 생존율

갈근 추출물이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 분석 및 측정하였다[27]. B16F10세포를 96 well plate에 well 당  $3 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 시약을 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL의

농도로 희석하여 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 NR solution (Sigma-Aldrich, USA) 이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여 3 시간 동안 배양한 다음 세포 고정액으로 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 mL로 20분 처리하여 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 mL을 가하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였다. 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(%)=

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

### 2.2.5. 멜라닌 생성 저해능 측정

갈근 추출물의 멜라닌 생성 저해능을 측정하기 위하여 B16F10세포를 이용하여 측정하였다[28]. B16F10세포를 96 well plate에 well당  $2 \times 10^3$  cell/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 배양하였다. 세포 부착 확인 후 멜라닌 생성을 촉진하기 위하여 혈청 3%와  $\alpha$ -MSH 100 nM이 포함된 배지로 갈아준 후, positive control로 arbutin 100, 200, 300  $\mu$ g/mL와 갈근 추출물을 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양하였다. 분비된 멜라닌의 양은 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 생합성 억제율을  $\alpha$ -MSH 100 nM을 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

멜라닌 생합성 억제율(%) = 100 -

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 갈근 추출물의 항산화 활성

#### 3.1.1. DPPH radical scavenging activity 측정

갈근 추출물의 전자 공여능을 알아보기로 DPPH 용액을 이용하여 radical 소거 활성을 측정된 결과 Fig. 1에 나타내었다. 실험 결과 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid은 1 mg/mL 농도에서 97.6%의 높은 radical 소거 활성을 확인하였으며, 갈근 추출물을 농도 별로 처리 시 13.1%, 40.5%, 65.2%, 81%로 농도가 증가할수록 radical 소거 활성이 증가 되는 것을 확인하였다. DPPH는 안정된 free radical을 가지며 수소 공여를 통해 산화되어 소거되며 이 과정에서 진한 보라색에서 황색으로 정색 반응하는 것으로 알려져 있다[29]. 본 연구와는 갈근 추출물의 원산지나 추출 용매, 실험 농도 및 방법의 차이는 있지만 선행 실험 모두 농도가 증가할수록 DPPH radical 소거 활성이 증가되는 것을 확인하였다.

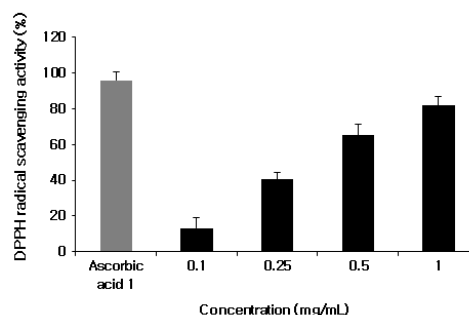


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of *Pueraria Lobata* root extract. Values represent mean  $\pm$  standard deviation of three measurements.

#### 3.1.2. Polyphenol 함량

갈근 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과 갈근 추출물은 농도가 증가 할수록 폴리페놀 함량이 증가 하였으며, 각 31.8 90.5 129.2 160.2 mg/g 의 높은 폴리페놀 함량을 확인하였다. Sebastien 등 [30]은 8 가지 flavonoid 물질들에 대한 항세포독성 효과를 검토한 결과, baicalein, quercetin 의 경우 다른 flavonoid 물질들에 비해 높은 활성을 나타내었으며, 혼용 사용 시 효과가 증가한다고 하였다. Shao 등[31]은 baicalein 성분의 cardiomyocytes 에서 산화제 스트레스 감소와 관련한 연구에서 baicalein 사용량이 증가할 수 록

세포 내 스트레스가 감소하였고, 세포의 자가 수복율이 증가한다고 보고하였다. 또한 baicalein은 cardiomyocytes에서의 산화적 스트레스가 hypoxia, 국소빈혈 및 미토콘드리아 수준에서 감소에 대한 효과가 나타났으며, 항산화 효과 역시 cardiomyocyte의 생존율의 증가와 관련이 있으며, 세포에서의 물질 이동 channel 통로의 물질 이동 제어를 통해 항산화 효과가 증가한다고 보고된 바가 있다[32].

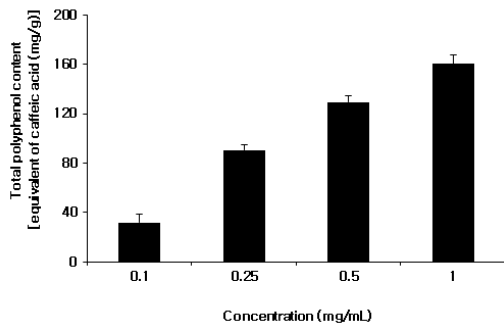


Fig. 2. Total polyphenol contents of *Pueraria Lobata* root extract.. Values represent mean  $\pm$  standard deviation of three measurements.

**3.1.3. Flavonoid 함량**

갈근 추출물의 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 갈근 추출물은 농도가 증가할수록 폴리페놀 함량이 증가하는 것처럼 플라보노이드의 함량도 농도가 증가할수록 플라보노이드 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 1 mg/mL의 농도에서 81.2 mg/g의 높은 총 플라보노이드 함량을 확인하였다. 플라보노이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있고, 구조에 따라 특정 플라보노이드는 항산화 및 항균성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다[33]. Lee 등[34]에 보고에 의하면, 천연물 복합체의 경우 많은 양의 페놀 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 이는 복합체를 구성하고 있는 생약제 및 추출물들의 대부분이 페놀화합물을 다량 함유하는 식물에서 기인한다고 보고되어지고 있다.

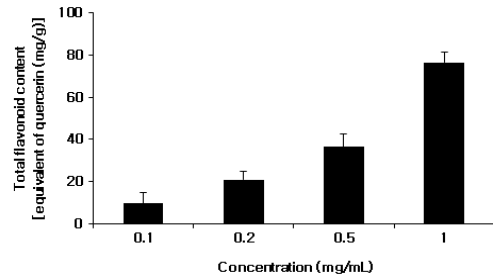


Fig. 3. Total flavonoid contents of *Pueraria Lobata* root extract. Values represent mean  $\pm$  standard deviation of three measurements.

**3.2. 갈근 추출물의 항 멜라닌 효과**

**3.2.1. B16F10세포에 대한 세포 생존율 측정**

우스 피부 유래 멜라닌 형성 세포인 B16F10세포에 대한 갈근 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 갈근 추출물을 농도별로 처리한 후 NR assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. B16F10 melanoma 세포에 갈근 추출물 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도별로 처리하여 세포 독성 평가를 실시하였다(Fig 4). 본 연구 결과, 98.2, 99.6, 99.8, 97.5, 97.2%의 세포 생존율을 확인하였으며, 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율이 나타났으며, 이와 같은 결과를 통하여 갈근 추출물이 B16F10 melanoma 세포에서 대한 유의한 세포독성이 없는 것을 확인하였으며, 다음 시험을 진행하였다.

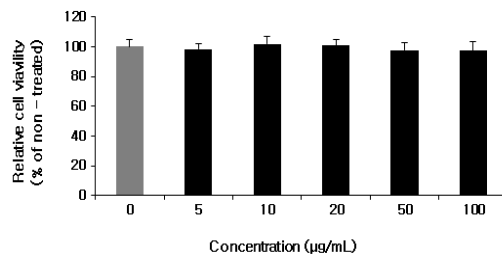


Fig. 4. Effect of *Pueraria Lobata* root extract on cell viability in B16F10 cells.

**3.2.2. B16F10세포에 대한 멜라닌 생합성 억제능 측정**

멜라닌은 tyrosinase의 작용에 의해 melanocyte의 표면에 melanosome을 생성하는 연쇄적이고

복합적인 과정을 거쳐 이루어진다.  $\alpha$ -MSH는 생체 내에서 생리적 기능에 관여하고 있는 호르몬으로서, 자외선에 의해 국소적으로 분비되어 멜라닌 세포를 자극하여 tyrosinase의 활성을 증가하여 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다[35-36]. 본 실험을 통하여 갈근 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하기 위해 B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유도하였으며, 갈근 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 생합성 억제능을 측정하였다. 실험 결과 양성 대조군으로 알부틴 100, 200, 300  $\mu$ g/mL을 사용하여 멜라닌 세포에 의해 생산된 멜라닌 생성량을 비교하였다. 본 실험 결과 갈근 추출물은 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 97.9%, 95%, 77.1%, 63.2%, 53.1%의 억제 효과를 나타내었으며, 갈근 추출물이 농도 의존적으로 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.(Fig. 5). 이상의 결과를 바탕으로 세포에 대한 독성이 거의 없고 멜라닌 생성을 줄여줄 수 있는 미백제로서 갈근 추출물이 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

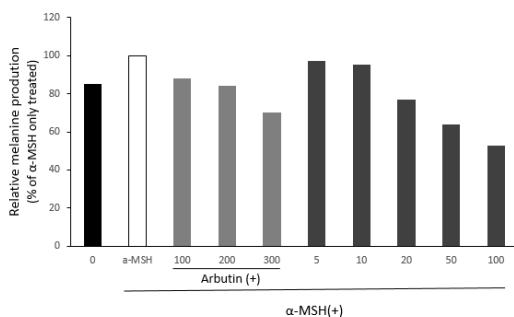


Fig. 5. Effect of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells by *Pueraria Lobata* root extract.

#### 4. 결론

본 연구는 갈근 추출물의 항산화 활성과 화장품 소재로서의 안전성을 평가하기 위하여 항산화 작용 효과 검증의 지표라고 할 수 있는 DPPH radical 소거 활성, 폴리페놀, 플라보노이드 함량 측정을 통하여 항산화 활성을 살펴보았다. 피부 세포의 평가를 위해, B16F10 melanoma 세포에서의 세포 생존율, 멜라닌 생합성 저해능을 평가

하였다. 본 실험 결과 갈근 추출물의 플라보노이드와 폴리페놀의 함량이 증가되는 것과, DPPH radical 소거 활성이 증가되는 것이 확인되었고, 본 연구를 통하여 갈근 추출물의 높은 항산화 활성을 확인하였다. 갈근 추출물의 농도에 따라 피부 세포 B16F10 melanoma에 생존율 측정된 결과 갈근 추출물이 95% 이상 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였고, 세포 독성이 낮은 것으로 결과가 나타났다. 또한 미백효과를 평가하고자, B16F10 melanoma에  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌 생합성을 유도한 후 갈근 추출물을 농도별로 처리한 결과 양성 대조군인 알부틴 보다 더 우수한 미백효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 연구에서는 갈근 추출물을 화장품 소재로 사용 시 피부의 안전성과 미백효과의 관점에서 기능성 화장품 소재로 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### References

1. Kim IC. "Antioxidative Property and Whitening Effect of the Polygoni Multiflori Radix, Polygonati Rhizoma and Ephedrae Herba", *J. of Korean Oil Chemists Soc.*, vol. 25, pp. 533-538, (2008).
2. Cho WG. "Comparision of Drug Delivery Using Hairless and Pig Skin", *J. of Korean Oil Chemiste Soc.*, vol. 24, pp. 410-417, (2007).
3. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Lee SE, Beak NI. "Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* vol. 47, pp. 135-140, (2005).
4. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. "Antioxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in korea", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* vol. 49, pp. 328-333, (2006).
5. Cha JY, Cho YS. "Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* vol. 28, pp. 1131-1136, (1999).
6. Helmersson J, Arnlöv J, Larsson A, Basu S. "Low dietary intake of beta-carotene,

- alpha-tocopherol and ascorbic acid is associated with increased inflammatory and oxidative stress status in a Swedish cohort”, *Br. J. Nutr.* vol. 15, pp. 1-8, (2008).
7. Koskas JP, Cillard J, Cillard P. Autoxidation of linoleic acid and behavior of its hydroperoxides with and without tocopherols. *JAACS.* vol. 61, pp. 1467-1472, (1984).
  8. Terao, J. “Autoxidation activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution”, *Lipids.* vol. 24, pp. 657-661, (1989).
  9. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju J. “Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants”, *Free Radical Biol. Med.* vol. 9, pp. 19-21, (1990).
  10. Cha, JY, Park SH, Heo JS, Cho YS. “Suppressive effect of administrated glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 on the oxidative stress in alcoholic fatty liver”, *J. Life Sci.* vol. 18, pp. 1053-1058, (2008).
  11. Eun YJ, Song YK, Lim HH, Kwon K, Rhim TJ. “Effects of Puerariae Radix extract on the activity of antioxidant. Korea Institute of Herbal Medicine”, vol. 12, pp. 53-62, (2007).
  12. Shin HJ, Yoo JE, Jung EH, Yoo DY. “Effects of Pueraria lobata on Body Weight and Gene Expression in Obese Rats Muscle with Estrogen Deficiency”, *THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY.* vol. 25, pp. 071-084, (2012).
  13. Hong JH, Park PS, Lee MY. “Effects of Puerariae radix extract on Experimentally Alloxan-induced Hyperglycemia in Rabbits”, *Natural science research.* vol. 15, pp. 123-129, (1992).
  14. Kim HP. “Anti-inflammatory activity of isoflavonoids from pueraria thunbergiana and biochanin A conjugates”, *KOSEF.* (1994).
  15. Han SH. “Effects of Extracts of Pueraria radix on Enzymes Activities of Serum and Lead Level of the Tissues of the Pb-administered Rats”, *Preventive Nutrition and Food Science.* vol. 4, pp. 914-919, (1996).
  16. 丹野與三太. 葛根の解熱作用に就きて. *日藥物誌.* vol. 33, pp. 263-8, (1941).
  17. Kim YS, Bu IK. “Effect of Puerariae Radix on Hippocampal Neurons in Ischemic Damaged Rats”, *Kor. J. Herbology.* vol. 19, pp. 77-82, (2004).
  18. Ryu BH, Lee BH, Ha MS, Kim DS, Sin DB, Nam KD. “Pueraria lobata Ohwi as an Osteoporosis Therapeutics”, *Kor. J. FOOD. SCI. TECHNOL.* vol. 34, pp. 710-718, (2002).
  19. Chang SS, Ostric-Matijasevic B, Oliver AL, Huang CL. “Natural antioxidants from rosemary and sage”, *J. Food Sci.* vol. 42, pp. 1102-1106, (1977).
  20. Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, El-Baroty GSA. “Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media”, *JAACS.* vol. 66, pp. 792-799, (1989).
  21. Frei B. Natural antioxidants in human health and disease. *Academic Press. San Diego.* vol. 24, pp. 40-55, (1994).
  22. Cooke PS, Naaz A. “Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Experimental biology and medicine*”, vol. 229, pp. 1127-35, (2004).
  23. Park CH. “Antioxidative components of the roots of Pueraria thunbergiana and its structure-activity relationships”, *Graduate School of Kyungshung University.* (2001).
  24. Blois MS. “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature.* vol. 181, pp. 1199-1200, (1958).
  25. Folin O, Denis W. “On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents”, *The Journal of Biological Chemistry.* vol. 12, pp. 239-243, (1912).
  26. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. “Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina”, *Journal*

- of *Ethnopharmacology*, vol. 71, pp. 109–114, (2000).
27. Borenfreund E, Puerner JA, “Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption”, *Toxicol. Lett.*, vol. 24, pp. 119, (1985).
  28. Lim HW, Cho NY, Yoon MY, Cha SB, Kim KW, Park YK, Lee JY. “Effect of citrus essential oils on melanin production in B16 melanoma cell”, *J. YakhakHoeji*, vol. 47, pp. 25, (2003).
  29. V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset, “Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method”, *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 609, (1997)
  30. Sébastien C, Calliste CA, Mazon MC, Hantz S, Duroux JL, Rawlison WD, Poly MC, Alain S. “Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication”, *Antivir. Reserch*, vol. 96, pp. 181–186, (2012).
  31. Shao ZH, Hoek TLV, Qin Y, Becher LB, Schumacker T, Li CQ, Dey L, Barth E, Halpern H, Rosen GM, Yuan CS. “Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes”, *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* vol. 282, pp. 999–1006, (2002).
  32. Walsh KR, Failla ML. “Transport and metabolism of equol by Caco-2 human intestinal cells”, *J. Agr. Food Chem.* vol. 57, pp. 8297–8302, (2009).
  33. Cho EK, Gal SW, Choi YJ. “Antioxidative activity and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of fermented medicinal plants (DeulBit) and its modulatory effects on nitric oxide production”, *J. Appl. Biol. Chem.* vol. 53, pp. 91–98, (2010).
  34. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. “Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado”. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* vol. 37, pp. 269–275, (2008).
  35. Chow LW, Wang SJ, Duh PD. Antibacterial activity of burdock. *Food Science* vol. 24, pp. 195–202, (1997).
  36. Duh PD. “Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen”, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, vol. 75, pp. 455–461, (1998).