

식물자원의 양성자 빔 조사에 대한 라디칼 소거능활성의 민감도

문 병 식 · 이 갑 득[†]

동국대학교 화학과

(2009년 8월 6일 접수, 2009년 8월 26일 수정, 2009년 9월 3일 채택)

Proton Beam Sensitivity of Radical Scavenging Activity from Plant Resources

Byung Sik Moon and Kap Duk Lee[†]

Department of Chemistry, Dongguk University, 707, Seokjang-dong, Gyeongju-si, Gyeongbuk 780-714, Korea.

(Received August 6, 2009; Revised August 26, 2009; Accepted September 3, 2009)

요약: 식물 20종을 메탄올로 추출하여 양성자 빔 조사 에너지양(1, 5, 10 KGray)에 따른 항산화 활성 능력을 탐색 하고자 DPPH 라디칼 소거활성과 ABTS free 라디칼 소거 활성에 대하여 조사하였다. 양성자 빔 조사 시 15종류는 활성이 증가 하였으나 10 KGray에서 흑측(*Pharbitis nil* Choisy)은 활성이 감소하였으며, 4종류는 활성변화가 없었다. DPPH 라디칼 소거활성은 1 및 5 KGray에서 유근피(*Ulmus macrocarpa*) (84 %), 10 KGray (85 %)로 가장 높았으나 10 KGray에서 흑측(*Pharbitis nil* Choisy)은 6 % 감소하였다. IC₅₀값을 무처리구와 빔 조사량에 대한 활성을 비교하면 1 KGray 에서 산약(*Dioscorea batatas* Decne.) 6.3배, 5 KGray에서 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Max.) 2.1배, 산약(*Dioscorea batatas* Decne.) 2.8배 증가하였다. ABTS free 라디칼 소거활성에서 1 KGray의 양성자 빔 에너지를 조사 했을 경우, 가자(*Terminalia chebula* Retzius)는 60 % 증가하였다. IC₅₀값은 1 KGray 빔 조사 시 0 KGray보다 마황근(*Ephedra sinica* Stapf) 2.0배, 가자(*Terminalia chebula* Retz.) 2.5배, 우방자(*Arctium lappa* Linne) 2.4배 증가하였다.

Abstract: 20 species of plants were extracted with Methanol and were investigated for DPPH radical scavenging activity and ABTs free radical scavenging activity to quest anti-oxidation ability depending on the proton beam irradiation quantity. In the proton beam irradiation, 15 species's activities increased but among them, *Pharbitis nil* Choisy decreased at 10 KGray and 4 species' activity didn't change at all. In hydrogen ion radical elimination activity, *Ulmus macrocarpa* (84 %) showed the highest and *Pharbitis nil* Choisy showed 6 % decreasing at more than 1 KGray. By comparison with untreated IC₅₀ value, the beam-treated IC₅₀ value increased 6.3 times for *Dioscorea batatas* Decne. at 1 KGray, 2.1 times for *Trichosanthes kirilowii* Max., and 2.8 times for *Dioscorea batatas* Decne. at 5 KGray. In ABTs free radical elimination activity, the activity increased 60 % for *Terminalia chebula* Retzius compared with untreated one. Besides, the beam-treated IC₅₀ value increased 2 times for Gray *Ephedra sinica* Stapf, 2.5 times for *Terminalia chebula* Retz. and 2.4 times for *Arctium lappa* Linne at 1 KGray.

Keywords: antioxidant, proton beam irradiation, DPPH, ABTS, scavenging activity

1. 서 론

항산화제는 기능성 또는 생리활성물질의 하나로 식품의 변질을 방지하고 인체의 각종질병예방 및 노화방지의 효과가 있는 것으로 알려져 있다[1-3]. 기존의 항산화제

는 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxy anisole (BHA) 등과 같은 합성 항산화제와 ascorbic acid 같은 천연 항산화제가 알려져 있으나[1,4-7], 합성 항산화제인 BHT, BHA는 우수한 효과는 있지만 독성이 문제되어 사용이 기피되고 있다. 이러한 문제점을 개선할 수 있는 효과적이고 안전한 항산화제의 개발이 요구되고 있으며 많은 연구자들은 다양한 자원으로부터

[†] 주 저자 (e-mail: kdlee@mail.dongguk.ac.kr)

천연 항산화제 개발을 활발히 진행하고 있다[8,9]. 최근에는 양성자 빔을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 양성자 빔은 양성자 가속기를 이용하는데 원리는 원자가 원자핵(+)과 전자(-)로 이루어져 있기 때문에 원자핵 내의 양성자(proton)만을 꺼내어 +와 -의 전기를 띠고 있는 가속관 속을 통과시켜 그때 생기는 전기력을 이용해 전기를 띤 입자들의 운동에너지를 열에너지로 변환하여 의료분야에서는 암치료, 원자력분야에서는 중성자 및 방사선동위원소 생산 등 핵을 다룰 수 있는 중요한 수단으로 인식되고 있다. 그 중 양성자 빔을 이용한 연구로는 금속이온의 효과[10], 화훼류 및 채소작물[11,12], 버섯종균[13] 등 육종학에 대하여 보고된 바 있다. 그러나 양성자 빔을 이용한 천연물 추출물에 대한 항산화 활성 연구는 아직 보고된 바 없다. 필자는 17종의 식물자원 추출물과 기존 항산화제 3종류에 대하여[14] 양성자 빔을 이용하여 항산화력을 검색하여 보고한 바 있다.

본 연구는 이전에 검색하지 못한 20여 종의 식물자원 추출물에 대해서 양성자 빔을 이용하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성법과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolinesulfonic acid) cation radical (ABTS^{·+}) 소거 활성법을 통하여 항산화 활성변화를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시료의 조제

실험에 사용된 20종류의 식물은 경주시 월성 한약사에서 구입한 후 동국대학교 한의과대학으로부터 감정 받은 다음 사용하였다. 추출물은 건조된 약용식물 200 g을 분말로 만든 후 70 % 메탄올 1.5 L을 가하여 상온에서 48 h 동안 추출 및 여과한 후 감압 농축하고 진공 건조하였다. 시료 1 g을 두께 0.2 mm polypropylene tube (Falcon, USA)에 채취한 다음 양성자 빔 조사 시료로 사용하였다. 양성자 빔 조사 후 시료는 대조군과 함께 -78 °C에서 냉장 보관하여 실험시료로 사용하였다.

2.2. 양성자 빔 조사조건

빔 에너지 45 MeV, 빔 전류 10 nA, Dose rate [Gy/sec] 1.91 그리고 LET [KeV/ μ m] 1.6의 저 선량 양성자 빔(MC-50 싸이클로트론, Scantronix, Sweden)을 실온에서 각각 1, 5 및 10 KGray의 총 흡수선량을 시료에 조사하였다. 총 흡수선량의 오차범위는 ± 0.2 KGray였다.

2.3. 항산화 활성 검색

2.3.1. DPPH Radical 소거활성검색

DPPH radical 소거활성은 Brand-Williams[15]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 96 well plate에 DPPH solution (1.5×10^{-4} M, Ethanol) 90 μ L와 시료 10 μ L을 가한 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 각 반응 액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 전보[14]와 동일한 식에 의하여 구하였다.

2.3.2. ABTS^{·+} 소거활성

ABTS^{·+} 소거활성은 ABTS^{·+} 용액과 4.9 mM potassium persulfate를 암 조건하에서 24 h 동안 반응시킨 후 96 well plate에 50 μ L의 H₂O, 140 μ L의 ABTS^{·+} ($A_{734nm} = 0.7$), 10 μ L 시료를 혼합하여 실온에서 7 min 동안 반응시킨 다음 흡광도 734 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

2.4. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거활성

식물 추출물 20종을 양성자 빔 조사 양에 따른 활성을 측정하였다. 실험 결과는 Table 1과 같다. 대부분 시료들은 양성자 빔 조사에 의한 활성을 나타내었다. 양성자 빔 조사량(1, 5, 10 KGray)에 따른 추출물 실험에서 0 KGray에 비하여 4 종류의 시료는 활성변화가 없었으나 10 KGray에서 흑축(*Pharbitis nil* Choisy)은 활성이 6 % 감소하였으며 15 종류의 시료는 활성이 증가하였다. 양성자 빔 조사량 별로 활성을 비교한 결과 1 KGray에서 30 % 이상 활성이 증가한 것은 유근피(*Ulmus macrocarpa*), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne), 천마(*Gastrodia elata* Blume)이며 특히 유근피(*Ulmus macrocarpa*)는 활성이 84 % 증가하였다. 5 KGray에서 유근피(*Ulmus macrocarpa*), 산수유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc), 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Max.), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne)은 30 % 이상 증가하였으며, 특히 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Max.) (52 %), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne) (65 %), 유근피(*Ulmus macrocarpa*) (84 %)도 활성이 증가하였다. 10 KGray에서

Table 1. DPPH Radical Inhibitory Activities of Methanol Extracts from Plant and Antioxidants by Proton Beam Irradiation

Scientific name	Dose rate (Gray)	0	1,000	5,000	10,000	^a IC ₅₀ (μg/mL)
<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.		^b 15 ± 0.04	20 ± 0.02	20 ± 0.02	22 ± 0.02	8.5 μg/mL
<i>Prunus mume</i> Sieb.et Zucc.		18 ± 0.03	20 ± 0.03	20 ± 0.06	20 ± 0.03	8.4 μg/mL
<i>Terminalia chebula</i> Retz.		25 ± 0.03	26 ± 0.06	26 ± 0.05	26 ± 0.05	5.8 μg/mL
<i>Ulmus macrocarpa</i>		3 ± 0.13	19 ± 0.06	19 ± 0.04	19 ± 0.05	16.8 μg/mL
<i>Achyranthes bidentata</i> Bl.		15 ± 0.02	15 ± 0.02	20 ± 0.03	20 ± 0.05	15 μg/mL
<i>Forsythia viridissima</i> Lindl.		16 ± 0.02	16 ± 0.05	17 ± 0.05	17 ± 0.02	16 μg/mL
<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.		22 ± 0.12	24 ± 0.11	32 ± 0.02	32 ± 0.04	10.5 μg/mL
<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Smith		21 ± 0.03	26 ± 0.06	26 ± 0.05	26 ± 0.05	6.2 μg/mL
<i>Arctium lappa</i> Linne		16 ± 0.03	18 ± 0.08	18 ± 0.06	18 ± 0.01	13.5 μg/mL
<i>Helianthus annuus</i> L.		10 ± 0.01	14 ± 0.03	14 ± 0.02	14 ± 0.11	17.5 μg/mL
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Max.		10 ± 0.08	10 ± 0.01	21 ± 0.02	21 ± 0.04	24.5 μg/mL
<i>Dioscorea batatas</i> Decne.		6 ± 0.06	17 ± 0.07	17 ± 0.11	17 ± 0.07	14.4 μg/mL
<i>Gastrodia elata</i> Bl.		3 ± 0.02	5 ± 0.02	5 ± 0.03	6 ± 0.05	> 100 μg/mL
<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.		7 ± 0.12	9 ± 0.11	10 ± 0.02	10 ± 0.04	> 100 μg/mL
<i>Pharbitis nil</i> Choisy		16 ± 0.02	16 ± 0.05	16 ± 0.04	15 ± 0.01	15.3 μg/mL
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> (Rupr. et Max.) Seem.		10 ± 0.02	10 ± 0.02	11 ± 0.03	11 ± 0.05	24.5 μg/mL
<i>Ephedra sinica</i> Stapf		14 ± 0.01	14 ± 0.02	14 ± 0.06	14 ± 0.02	17.5 μg/mL
<i>Torilis japonica</i> (Houtt) Dc.		2 ± 0.02	2 ± 0.05	2 ± 0.05	2 ± 0.02	> 100 μg/mL
<i>Scirpus flaviatilis</i> (Torr.) A. Gray		6 ± 0.12	6 ± 0.05	6 ± 0.05	6 ± 0.03	> 100 μg/mL
<i>Quisqualis indica</i> Linne		2 ± 0.05	2 ± 0.06	2 ± 0.05	2 ± 0.06	> 100 μg/mL

All data are means of three determinations.

a The IC₅₀ (μg/mL) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve at 1,000 gray irradiation sample.

b Scavenging activity (%).

30 % 이상 활성이 증가한 것은 조각자(*Gleditsia sinensis* Lam), 유근피(*Ulmus macrocarpa*), 산수유(*Cornus officinalis* Siebold), 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Maximowicz), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne), 천마(*Gastrodia elata* Blume), 오미자(*Schizandra chinensis* Baillon)이며, 특히 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Max.) (52 %), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne) (65 %), 천마(*Gastrodia elata* Blume) (50 %), 유근피(*Ulmus macrocarpa*) (85 %)순으로 활성이 증가하였다. 1 KGray와 0 KGray의 IC₅₀ 값(μg/mL)을 비교하면 조각자(*Gleditsia sinensis* Lam.) (7.7 μg/mL)는 1.5배, 산약(*Dioscorea batatas* Decne.) (14.4 μg/mL)은 2.8배, 유근피(*Ulmus macrocarpa*) (16.8 μg/mL)는 6.3배 증가하였다. 5 KGray IC₅₀ 값(μg/mL)은 0 KGray에 비해서 산수유(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) (10.5 μg/mL) 1.5배, 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Max.)은 (24.5 μg/mL)에서 2.1배, 산약(*Dioscorea batatas* Decne.) (14.4 μg/

mL)는 1.8배 증가하였다. 그 이유는 양성자 빔 조사에 의해 천연물 내의 다양한 분자들의 화학결합이 파괴되어 새로운 화합물을 형성하거나, 파괴된 분자 조각이 그대로 남아있는 형태의 구조변화에 의한 영향 때문으로 사려된다.

3.2. ABTS^{·+} 소거활성

식물 추출물 20종을 양성자 빔 조사 양(1, 5, 10 KGray)에 따른 ABTS^{·+}의 소거활성을 측정하여 나타내었다(Table 2). 양성자 빔 조사량에 따라 다양한 경향을 보였다. 1 KGray는 0 KGray에 비해서 마황근(*Ephedra sinica* Stapf), 가자(*Terminalia chebula* Retzius), 우방자(*Arctium lappa* Linne)는 50 % 이상 증가 하였으며 특히 가자(*Terminalia chebula* Retzius)는 60 % 증가하였다. 5 KGray에서 우슬(*Achyranthes bidentata* Bl.)은 50 % 증가하였다. IC₅₀ 값(μg/mL)을 0 KGray에서 1 KGray와 비교하면 마황근(*Ephedra sinica*

Table 2. ABTS^{·+} Inhibitory Activities of Methanol Extracts from Plant and Antioxidants by Proton Beam Irradiation

Scientific name	Dose rate (Gray)	0	1,000	5,000	10,000	^a IC ₅₀ (μg/mL)
<i>Ephedra sinica</i> Stapf		^b 12 ± 0.02	24 ± 0.05	14 ± 0.04	12 ± 0.01	3.2 μg/mL
<i>Forsythia viridissima</i> Lindl.		15 ± 0.03	15 ± 0.03	15 ± 0.03	15 ± 0.03	5.2 μg/mL
<i>Pharbitis nil</i> Choisy		12 ± 0.12	12 ± 0.11	13 ± 0.02	12 ± 0.04	13.5 μg/mL
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> (Rupr. et Max.) Seem.		13 ± 0.02	13 ± 0.05	15 ± 0.04	15 ± 0.01	12.5 μg/mL
<i>Ulmus pumila</i> L.		20 ± 0.04	20 ± 0.02	20 ± 0.02	20 ± 0.02	4.8 μg/mL
<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.		8 ± 0.06	8 ± 0.07	6 ± 0.11	6 ± 0.07	> 50 μg/mL
<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.		10 ± 0.04	15 ± 0.02	15 ± 0.02	15 ± 0.02	5.2 μg/mL
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Max.		11 ± 0.02	11 ± 0.02	12 ± 0.02	12 ± 0.01	> 50 μg/mL
<i>Gastrodia elata</i> Bl.		9 ± 0.02	8 ± 0.05	9 ± 0.05	9 ± 0.02	> 50 μg/mL
<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Smith		8 ± 0.04	10 ± 0.03	8 ± 0.08	8 ± 0.06	> 50 μg/mL
<i>Terminalia chebula</i> Retz.		10 ± 0.13	25 ± 0.06	15 ± 0.04	15 ± 0.05	3.1 μg/mL
<i>Arctium lappa</i> Linne		5 ± 0.06	12 ± 0.03	8 ± 0.02	8 ± 0.02	13.6 μg/mL
<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.		8 ± 0.03	12 ± 0.03	12 ± 0.06	8 ± 0.03	13.2 μg/mL
<i>Achyranthes bidentata</i> Bl.		2 ± 0.06	3 ± 0.03	4 ± 0.02	2 ± 0.02	> 100 μg/mL
<i>Quisqualis indica</i> Linne		3 ± 0.03	5 ± 0.06	5 ± 0.05	4 ± 0.05	> 100 μg/mL
<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.		4 ± 0.08	3 ± 0.01	3 ± 0.02	4 ± 0.04	> 100 μg/mL
<i>Torilis japonica</i> (Houtt) Dc.		3 ± 0.13	3 ± 0.06	3 ± 0.04	3 ± 0.05	> 100 μg/mL
<i>Dioscorea batatas</i> Decne.		9 ± 0.12	9 ± 0.11	9 ± 0.02	9 ± 0.04	> 50 μg/mL
<i>Scirpus flaviatilis</i> (Torr.) A. Gray		2 ± 0.03	2 ± 0.08	2 ± 0.06	2 ± 0.01	> 100 μg/mL
<i>Helianthus annuus</i> L.		26 ± 0.05	24 ± 0.06	24 ± 0.05	24 ± 0.06	3.5 μg/mL

All data are means of three determinations.

a The IC₅₀ (μg/mL) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve at 1,000 gray irradiation sample.

b Scavenging activity (%).

Stapf) (3.2 μg/mL)에서 2배, 가자(*Terminalia chebula* Retz.) (3.1 μg/mL)는 2.5배 증가하였다. 최근 양성자 빔을 이용한 연구 중 육종학 분야는 화훼류 및 채소작물 [11,12], 균류 중 버섯이 주류를 이루고 있으나, 양성자 빔에 의한 버섯의 돌연변이 현상은 감마선 처리 결과와 유사한 경향을 나타내었다[13]. 저 선량의 감마선은 뇌 질환 방지, 감마선을 포함한 방사선 저 선량은 다양한 생물자극 효과에 의해 뇌질환을 막아주고 산화적 스트레스의 내성 증가[15], 유지의 항산화 능력을 증가 시킨다 [16]. 대두는 주로 isoflavonoid, polyphenol [17,18], peptide, 아미노산 및 인지질 등 항산화효과에 대한 연구보고가 있다[19,20]. 감마선은 원자핵이 붕괴하면서 발생하는 파동형태의 방사선으로 전자기파라고 할 수 있으며 양성자 선은 입자형태의 방사선으로 감마선보다 투과 할 수 있는 깊이가 더 크며, 브레이크 피크를 이용해 원하고자 하는 투과 깊이를 측정하여 다른 부위는 손상을 입히지

않고 특정 부위만 에너지를 전달 할 수 있는 장점이 있다. 양성자 빔 조사에 의한 항산화 활성 증가는 천연물의 성분 중 아미노산, 인지질, polyphenol 및 isoflavonoid 화합물 등의 고분자화합물들이 분해되거나 결합하여 새로운 화합물이 생성되거나 양성자에 의해서 구조변화가 활성에 영향을 미친 것으로 사료된다. 양성자 빔을 조사한 경우 항산화 활성 증가 또는 감소에 대한 원인을 규명하기 위하여 앞으로 이러한 활성을 가진 물질을 분리 정제 및 구조분석을 통한 더 많은 연구가 이루어져야 될 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국원자력연구소 양성자기반공학기술 사업단의 지역협력 프로그램 연구(2006-0538-0)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. R. Jeong, B. S. Kim, and Y. E. Lee, Physicochemical characteristics and antioxidative effects of Korean figs, *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **6**, 12 (2002).
2. G. T. Jung, I. O. Ju, J. S. Choi, and J. S. Hong, The antioxidative, antimicrobial and nitrate scavenging effects of *Schizandra chinensis ruprecht* (Omija) seed, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**, 928 (2000).
3. S. M. Kim, E. J. Kim, Y. S. Cho, and S. K. Sung, Antioxidant of pine extracts according to preparation method, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **28**, 984 (1999).
4. H. T. Barnes and C. C. Akoh, Effect of α -tocopherol, β -carotene and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6858 (2003).
5. C. S. Foote and R. W. Denny, Chemistry of singlet oxygen quenching by β -carotene, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233 (1968).
6. R. E. Hayes, G. N. Bookwalter, and E. B. Bagley, Antioxidant activity of soybean flours and derivatives-A review, *J. Food Sci.*, **42**, 1527 (1977).
7. J. K. Jang and J. Y. Han, The antioxidant ability of grape seed extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**, 524 (2002).
8. J. C. Park, S. K. Chung, J. M. Hur, J. H. Lee, M. R. Choi, S. H. Song, and J. W. Choi, Effects of the components and extracts of some edible and medicinal plants on the formation of lipide peroxidation in rat liver homogenate, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **26**, 1159 (1997).
9. Y. S. Rim, Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim, and Y. H. Choi, Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants, *J. Medicinal. Crop. Sci.*, **8**, 342 (2000).
10. Y. J. Kim, G. J. Cho, and J. H. Song, Ag^+ concentration effect on the shape of Au nanomaterials under proton beam irradiation, *NIMB. B*, **254**, 73 (2007).
11. C. H. Bae, Development of new ornamental plants and analysis of the mutants derived from ion beam irradiated plant organisms, *Proton Engineering Frontier Project, Korean Atomic Energy Research Institute* (2005).
12. Y. I. Lee and K. S. Lee, Mutation breeding of ornamental and vegetable crops by using lon beam, *Proton Engineering Frontier Project, Korean Atomic Energy Research Institute* (2005).
13. H. J. Kwon, Inducing mutation of mushroom by using proton beam, *Proton Engineering Frontier Project, Korean Atomic Energy Research Institute* (2005).
14. B. S. Moon, G. Y. Son, J. K. Choi, D. W. Seo, and K. D. Lee, Research of antioxidant activity from plant resources using proton beam(1), *J. Life Science*, **17**, 1100 (2007).
15. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **28**, 25 (1995).
16. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
17. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966 (1981).
18. K. Miura and N. Nakatani, Antioxidative activity of flavonoid from Thyme, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3043 (1989).
19. L. J. Marnett, Peroxyl free radical: potential mediators of tumor initiation and promotion, *Carcinogenesis*, **8**, 1365 (1987).
20. M. R. Sangor and D. E. Pratt, Lipid oxidation and fatty acid changes in beef combined with vegetables and textured vegetable protein, *J. Am. Diet Assoc.* **64**, 268 (1974).